

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Entwicklung lentiviraler Transgenese
in höheren Säugetieren

von

Andreas Hofmann

aus Viernheim

2006

Für meine Eltern

1. Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Alexander Pfeifer betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10.03.2006

Andreas Hofmann

Dissertation eingereicht am	13.03.2006
1. Gutachter	Prof. Dr. A. Pfeifer
2. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
mündliche Prüfung am	07.04.2006

2. Dank

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken, die mich während meines Aufenthaltes in München stets unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen konnte. Danke Mama, Papa und Heike.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer, in dessen Arbeitskreis ich meine Promotion durchführen konnte. Ohne seine stetige und exzellente Betreuung über alle Themengebiete hinweg und die Unterstützung bei sämtlichen aufgetretenen Problemen, wäre es mir nie möglich gewesen meine Arbeit so erfolgreich abzuschließen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Prof. Dr. Eckhart Wolf möchte ich herzlich für die hervorragende Kooperation mit seinem Arbeitskreis bei der Erzeugung transgener Schweine und Rinder danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Barbara Kessler, Sonja Ewerling und Myriam Weppert. Sie waren immer sofort zur Stelle wenn Probleme auftraten oder Proben benötigt wurden. Danke für die erfreuliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei der K.D.St.V. Vindelicia zu München im CV. Mein herzlichster Dank für die schöne Zeit geht an die Aktivitas, allen voran Armin Anzenbacher, Raphael Botor, Andrej Schlobinski, Wolfgang Berger alias Gene Wild, meinem ewigen Fuxmajor Martin Prescher und meinem Leibburschen Mark Kirsch. Ich danke der Vindeliker Studentenhilfe e.V., daß ich so lange adH wohnen durfte, und allen Bewohnern des ersten und einzig wahren Stockes für die gemeinsamen Stunden. Außerdem wünsche ich Stefan Schulze, der die Ehre und Befähigung hat mein adäquater Nachfolger zu werden, viel Glück und Erfolg beim Antritt meines Erbes. Es ist schön zu wissen, daß man selbst als Externer und nach längerer Abwesenheit immer einen Anlaufpunkt in der Weltstadt München hat, wo man als Freund und Bundesbruder empfangen wird.

Ich danke meinen Arbeitskollegen für die nette Zusammenarbeit und die gegenseitige Hilfe und Unterstützung, allen voran meiner Labor-Partnerin Katharina Hennecke, die viel zur Kurzweiligkeit im Laboralltag beigetragen hat, und Bodo Haas für Du weißt schon was... Mein ganz besonderer Dank geht an Andrea Kabermann und Heidi Sebald für die hervorragende Arbeit in den vergangenen Jahren. Last but not least, vielen Dank an Diana Messow für die gute und angenehme Zusammenarbeit, die hoffentlich auch weiterhin so bleiben und von viel Erfolg gekrönt sein wird.

Danke auch an Dr. Stelios Michalakis, Dr. Christian Wahl-Schott, Dr. Robert Mader, Dr. Sabine Hüttl, Daniela Scholz, Christian Eckert, Heidi Geiger und Ludwig Baumann für die gemeinsame Zeit.

Mein ergebenster Dank gehe an dieser Stelle an die GründungsMITglieder des P.D.M. für die Aufnahme in ihren exklusiven Verein und natürlich an alle P.D.M.-MITglieder für manch lustige und gesellige Runde.

Ich danke Armin Anzenbacher, Dr. Stelios Michalakis und besonders Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer für das kritische und konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke meinen alten Arbeitskollegen Barbara Vogg und Dr. Harald Ludwig für die lustige Zeit und hoffe auch weiterhin mit Euch in Kontakt zu bleiben.

Danke an meine alten Freunde aus der Heimat, die mittlerweile ich der ganzen Welt verstreut sind, und an meine ehemaligen Studienkollegen aus Kaiserlautern für den ganzen Spaß, den wir zusammen hatten.

Abschließend nochmals vielen Dank an alle, die dazu beigetragen haben meinen Aufenthalt in München so angenehm und erfreulich zu gestalten. Ich werde die Stadt, die Leute und vor allem die Biergarten-Kultur wirklich vermissen und hoffe, eines Tages wieder hierher zurück kommen zu können.

3. Inhaltsverzeichnis

1.	Erklärung.....	2
2.	Dank	3
3.	Inhaltsverzeichnis.....	5
4.	Abkürzungen und Erklärungen	7
5.	Einleitung	12
5.1.	Lentiviren	12
5.2.	Virale Vektoren.....	15
5.3.	Entwicklung lentiviraler Vektoren	16
5.4.	Transgene Tiere.....	18
5.4.1.	Historische Entwicklung der transgenen Technologie.....	20
5.4.2.	Transkriptionelles Silencing.....	21
5.4.3.	DNA-Mikroinjektion.....	22
5.4.4.	Lentivirale Transgenese in Mäusen.....	23
5.4.5.	Transgene Nutztiere	23
6.	Zielstellung der Arbeit	26
7.	Material und Methoden	28
7.1.	Lentiviren	28
7.1.1.	Virus-Plasmide	28
7.1.2.	Virusplasmid-Maxipräparation	30
7.1.3.	Produktion rekombinanter Lentiviren	30
7.1.4.	Bestimmung des Virus-Titers.....	32
7.2.	Erzeugung transgener Tiere	33
7.2.1.	Transgene Schweine.....	33
7.2.2.	Transgene Rinder	34
7.3.	In vivo Fluoreszenz-Imaging	35
7.4.	Gewebe- und Proben-Isolierung.....	35
7.5.	Isolierung genomischer DNA.....	35
7.6.	Southern Blot Analyse	36
7.7.	Protein Isolierung	38
7.8.	Western Blot Analyse.....	39
7.9.	Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese	40
7.10.	Zellkultur	41
7.11.	Immunhistochemie	42
7.12.	Mikroskopie	44
7.13.	Bisulfit Sequenzierung	44
7.14.	Auftrennung, Isolierung und Modifikation von DNA	46
7.15.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
7.16.	Sequenzierung von DNA	50
8.	Ergebnisse	51
8.1.	Erzeugung transgener Schweine	51
8.1.1.	Subzonale Virusinjektion und Embryo-Transfer	51
8.1.2.	<i>In vivo</i> Analyse der eGFP-Expression	53
8.1.3.	Analyse der geborenen Tiere.....	54
8.1.4.	Untersuchung des Mosaicismus	55

8.1.5.	Expressionsanalyse verschiedener Organe.....	57
8.1.6.	Einfluß der Integrantenzahl auf die Transgen-Expression.....	60
8.1.7.	Statistische Auswertung.....	61
8.1.8.	Untersuchungen zur Keimbahntransmission des Transgens.....	62
8.1.9.	Gewebespezifische Transgen-Expression in Schweinen	67
8.2.	Lentivirale Transgenese im Rind	71
8.2.1.	Infektion von Rinder-Oozyten und -Zygoten.....	71
8.2.2.	Analyse der geborenen Tiere.....	73
8.2.3.	Keimbahntransmission	76
8.2.4.	Transgen-Expression im Milchdrüsengewebe	76
8.2.5.	Statistische Auswertung.....	77
8.2.6.	Erzeugung lentiviral transgener Rinder durch Kerntransfer	78
8.3.	Epigenetische Regulation lentiviraler Transgen-Vektoren	80
8.3.1.	Variationen im Expressions-Level verschiedener Integranten.....	81
8.3.2.	Analyse der integrierten Proviren	83
8.3.3.	Untersuchung der epigenetischen Regulation	84
8.3.4.	Untersuchung der proviralen Methylierung mittels Bisulfit-Sequenzierung	88
8.3.5.	Effekte von 5-AzaC und TSA auf die Transgen-Expression	90
9.	Diskussion.....	92
9.1.	Lentivirale Transgenese	92
9.2.	Verwendetes Vektor-Konstrukt.....	93
9.3.	Lentivirale Infektion von Schweine- und Rinder-Embryonen.....	93
9.4.	Epigenetische Regulation lentiviraler Vektoren	95
9.5.	Nachteile der Vektoren und potentielle Risiken	98
9.6.	Aktueller Stand der lentiviralen Transgenese	100
9.7.	Ausblick	101
9.7.1.	Lentivirale Transgenese und Kerntransfer	101
9.7.2.	Lentiviral vermittelte RNA-Interferenz	102
9.7.3.	Einsatz regulierbarer Vektoren.....	103
10.	Zusammenfassung.....	105
11.	Anhang	108
11.1.	Vektor-Maps.....	108
11.2.	Bisulfit-Sequenzierung.....	111
12.	Zitierte Literatur	112
13.	Veröffentlichungen, Abstracts und Preise.....	121
13.1.	Veröffentlichungen.....	121
13.2.	Abstracts.....	121
13.3.	Preise	122
14.	Lebenslauf.....	123

4. Abkürzungen und Erklärungen

5-AzaC	5-Azacytidin
5mo	5 Monate alt
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
ad	bis zu bestimmtem Volumen auffüllen
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (engl.für erworbenes Immundefektsyndrom)
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-Triphosphat
BACs	Bacterial Artificial Chromosomes
BCIP	8-bromo-4-chloro-3-indoyl-Phosphat
BES	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BBS	Bes Buffered Saline, Transfektions-Puffer
BIV	bovines Immundefizienzvirus
bp	Basenpaare
BS	Bisulfit-Lösung
BSA	bovines Serum-Albumin
CA	Viruscapsid des Wildtyp-HIV
CAEV	caprines Arthritis-Enzephalitis-Virus
CAG	Chicken β -Aktin / CMV-Verstärker Hybrid
CCR5	Chemokin-Rezeptor
CD4	Erkennungsmolekül, das z. B. an der Oberfläche von T-Lymphozyten vorkommt
cDNA	doppelsträngige DNA
CMV	Cytomegalovirus
COCs	Komplexe aus Kumuluszellen und Oozyten
CpG	CG-Dinukleotid
cPPT	zentraler Polypurin-Trakt
CXCR4	Chemokin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-Phenylindol
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin
ddNTP	Didesoxynukleotide

$\Delta\psi$	Deletion des Verpackungssignals
$\Delta U3$	mutierte U3-Region der LTRs lentiviraler Vektoren
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-MI	DNA-Mikroinjektion
Dnmt3a	<i>De-novo</i> Methyltransferase 3a
Dnmt3b	<i>De-novo</i> Methyltransferase 3b
dNTPs	Desoxynucleotid-Triphosphat Mix
(ds)RNA	doppelsträngige RNA
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
eGFP	enhanced GFP
EIAV	Virus der infektiösen Anämie der Pferde
<i>env</i>	Env-Gen von HIV
ES	embryonale Stammzellen
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
FIV	felines Immundefizienzvirus
FKS	fetales Kälber-Serum
<i>gag</i>	Gag-Gen von HIV
gp120	virale Glykoproteine der Hüllenmembran von Wildtyp-HIV
gp41	transmembranes Protein der Hüllenmembran von Wildtyp-HIV
H&E	Hämatoxilin und Eosin Färbung
HAR	Hyperakute Abstoßung
HBsAg	Hepatitis B Oberflächenantigen
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution, physiologischer Salzpuffer
HDACs	Histon-Deacetylasen
HEK293T	human embryonic kidney, immortalisierte humane Zelllinie
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HP-1	Heterochromatin-Protein 1
HS4	HS4-Region des Hühner- β -Globin LCRs
HSC	hematopoietischen Stammzellen

ICM	innere Zellmasse
JDV	bovines Jembrana Disease Virus
K14	humaner Keratin-14 Promoter
kB	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Monokalium-Hydrogephosphat
k.o.	knock-out
KRAB	Krüppel-assoziierte Box
LacZ	β-D-Galactosidase
LB ⁺	Luria-Bertani Medium mit Glukose
LCRs	Locus Control Regions
LMO2	T-Zell Onkogen und essentieller hämatopoetischer Faktor
loxP	34bp cis-aktive Sequenzen, Target-Sequenz der Cre-Rekombinase
LTR	long terminal repeat
LV-CMV	lentiviraler Vektor mit CMV-eGFP Expressionskassette
LV-K14	lentiviraler Vektor mit K14-eGFP Expressionskassette
LV-PGK	lentiviraler Vektor mit PGK-eGFP Expressionskassette
MA	Matrixprotein von Wildtyp-HIV
mCpGs	methylierte CpGs
MeCP2	methyl-CpG bindendes Protein 2
MII	Metaphase II
mRNA	Boten-RNA
MuLV	murines Leukämie-Virus
MVV	Maedi-Visna Virus der Schafe
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogen-Phosphat
nb	new born (engl. für neu geboren)
NBT	Nitrotetrazolium Blau
<i>nef</i>	akzessorisches HIV-Gen
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
NT	Kerntransfer
OCT	optimal cutting temperature compound, Einbettmedium
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Primer-Bindungsstelle
PBS	Phosphate Buffered Saline, physiologischer Salzpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PGK-TAg	lentiviraler Vektor mit einer PGK-TAg Expressionskassette
PIC	Präintegrationskomplex
<i>pol</i>	Pol-Gen von HIV-1
ψ	Psi; Verpackungs-Sequenz
R	R-Region (redundant) der LTRs von HIV
<i>rev</i>	regulator of expression, regulatorisches HIV-Gen
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>RRE</i>	<i>rev</i> response element, Bindungsstelle von <i>rev</i>
RRL	Bezeichnung für lentivirales Vektor-Plasmid
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SD	Spleißdonorstelle
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SFCA	Tensid-freies Cellulose-Acetat
shRNAs	short hairpin RNAs
SIN	selbst-inaktivierend
siRNA	small interfering RNA
SIV	Affenimmundefizienzvirus
S/MARs	Matrix- oder Scaffold Attachment Regions
SV40	simian virus 40
T4	Phage T4
TAg	Large Tumor Antigen des SV40
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>

TAR	trans-activation response, Bindungsstelle von <i>tat</i>
<i>tat</i>	transactivator of transcription, regulatorisches HIV-Gen
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline, Salzpuffer
TE	Tris-EDTA Puffer
tg	transgen
Tris	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TSA	Trichostatin A
tTA	<i>trans</i> -aktivierender Induktor
tTR	tet-Repressor
tTRKRAB	Fusion des tet-Repressors mit KRAB
U3	U3-Region der LTRs von HIV
U5	U5-Region der LTRs von HIV
UV	Ultraviolett
<i>vif</i>	akzessorisches HIV-Gen
<i>vpr</i>	akzessorisches HIV-Gen
<i>vpu</i>	akzessorisches HIV-Gen
<i>VSV.G</i>	G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus
well	Loch; 24-well-Platte = Platte mit 24 Löchern
WPRE	posttranskriptionell regulatorisches Elements des Woodchuck Hepatitis-Virus
wt	Wildtyp
XL-1	kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien-Stamm

5. Einleitung

5.1. Lentiviren

Lentiviren zählen zur Familie der *Retroviridae* (Coffin, 1990; Coffin, 1992; Doolittle *et al.*, 1990; Shaunak and Weber, 1992). Sie tragen ein komplexes virales Genom und haben wie alle Retroviren die Fähigkeit ihr RNA-Genom durch die reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umzuschreiben (Coffin, 1990). Bereits 1983 wurden die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 von Robert C. Gallo am National Institute of Health in Bethesda und von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert (Review in (Gallo and Montagnier, 1987)). Das circa 10.000 Basen große virale Genom von HIV-1 zählt mittlerweile zu den wohl am häufigsten untersuchten und am besten charakterisierten DNA-Sequenzen der Welt. In tierischen Organismen sind bisher folgende Lentiviren beschrieben: Das Affenimmundefizienzvirus (SIV), das feline Immundefizienzvirus (FIV), das bovine Immundefizienzvirus (BIV), das bovine Jembrana Disease Virus (JDV), das Maedi-Visna-Virus der Schafe (MVV), das Virus der infektiösen Anämie der Pferde (EIAV) und das caprine Arthritis-Enzephalitis-Virus (CAEV) (Delenda, 2004; Lever *et al.*, 2004).

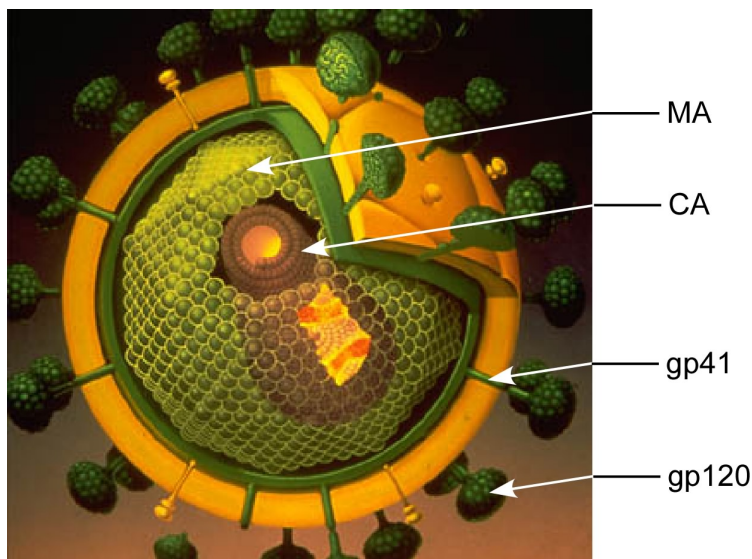


Abbildung 1. Schematischer Aufbau eines Lentivirus-Partikels am Beispiel von HIV-1. (Bild modifiziert nach http://www.aids-info.ch/bilder/schule_aids/jpg_bilder/koch6_2.jpg).

Lentiviren haben einen Durchmesser von etwa 100nm (Coffin, 1992). Sie besitzen eine Hülle, auf deren Oberfläche virale Glykoproteine (gp120 und gp41) verankert sind (Abbildung 1) (Coffin, 1992). Die Matrixproteine (MA) sind mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden und bilden eine isometrische Struktur (Abbildung 1). Das konische Viruscapsid (CA) enthält zwei identische Moleküle einzelsträngige RNA (das virale Genom), die von einem Nukleocapsid umschlossen sind (Abbildung 1). Als weitere Komponenten befinden sich im Viruspartikel die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (Coffin, 1992). Das lentivirale Genom trägt die für Retroviren typischen Gene: *gag* (Capsid-Proteine, gruppenspezifische Antigene), *pol* (enzymatische Aktivitäten) und *env* (Hüllen-Glykoproteine) (Abbildung 2). Nach der reversen Transkription wird die Erbinformation als doppelsträngige DNA in den Zellkern transportiert und - als Provirus - in das Genom der Zielzelle integriert (Abbildung 3 und Abbildung 7). Zum Komplex der gruppenspezifischen Antigene zählen die Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine. Sie werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprodukt synthetisiert, welches von der viralen Protease gespalten wird (Gottlinger *et al.*, 1989; Swanstrom and Wills, 1997). Die Gene für die virale Protease, reverse Transkriptase und Integrase liegen im zentralen Bereich des Genoms (*pol*). Auch die viralen Enzyme werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprodukt synthetisiert (Jacks *et al.*, 1988; Parkin *et al.*, 1992).

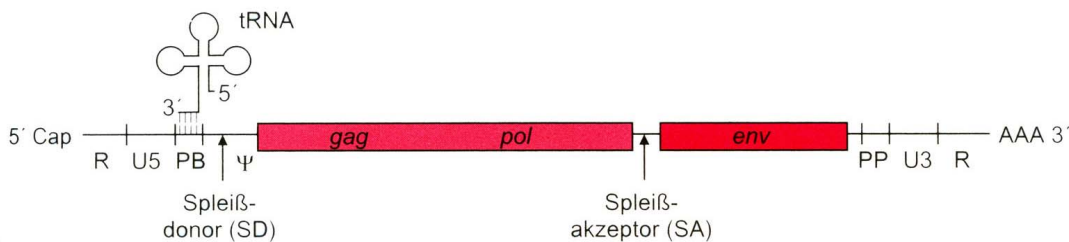


Abbildung 2. RNA-Genom eines Retrovirus. Abbildung aus (Modrow *et al.*, 2003).

Das virale Genom wird von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert (Abbildung 2). Diese sind essentiell für die reverse Transkription sowie für die Integration der viralen Erbinformation (Kao *et al.*, 1987; Starcich *et al.*, 1985). Die R-Region ("redundant") schließt 5' direkt an die Cap-Struktur an (Abbildung 2) und liegt in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende des Genoms vor (Starcich *et al.*, 1985). Die U5-Region ("unique") ist wichtig für die Integration des Provirus in das Wirts-Chromosom. Nach der Primer-Bindungsstelle (PB) folgt eine Spleißdonorstelle (SD). Sie ist verantwortlich für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle (Abbildung 2) (Starcich *et al.*, 1985). Benachbart findet man eine als ψ bezeichnete

Sequenz, die für die Verpackung der viralen RNA in die Viruspartikel essentiell ist (Berglund *et al.*, 1997; Clever *et al.*, 2000). Die U3-Region wird bei der Umschreibung des RNA-Genoms in doppelsträngige DNA verdoppelt und nach 5' kopiert (LTR-Konversion) (siehe Abbildung 7). U3 bildet zusammen mit R und U5 die viralen LTRs (long terminal repeats) und beinhaltet ebenfalls wichtige Basenfolgen für die Integration. Daneben ist die U3-Region auch für die Genexpression des Provirus wichtig. Sie enthält Promotoren und *cis*-aktive Elemente, an welche zelluläre Proteine binden (Starcich *et al.*, 1985).

Einfache Retroviren, wie das murine Leukämie-Virus (MuLV), können die Kernmembran der Wirts-Zelle nicht selbstständig überwinden (Miller *et al.*, 1990). Deshalb können sie nur Zellen infizieren die eine mitotische Teilung durchlaufen (Abbildung 3), da hierbei kurzzeitig die Kernmembran aufgelöst wird (Miller *et al.*, 1990). Lentiviren dagegen besitzen weitere regulatorische (*tat* und *rev*) und akzessorische (*vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*) Gene (siehe Abbildung 5) (Review in (Pfeifer and Verma, 2001)) und können auch nicht-teilende Zellen infizieren (Naldini *et al.*, 1996) (Abbildung 3).

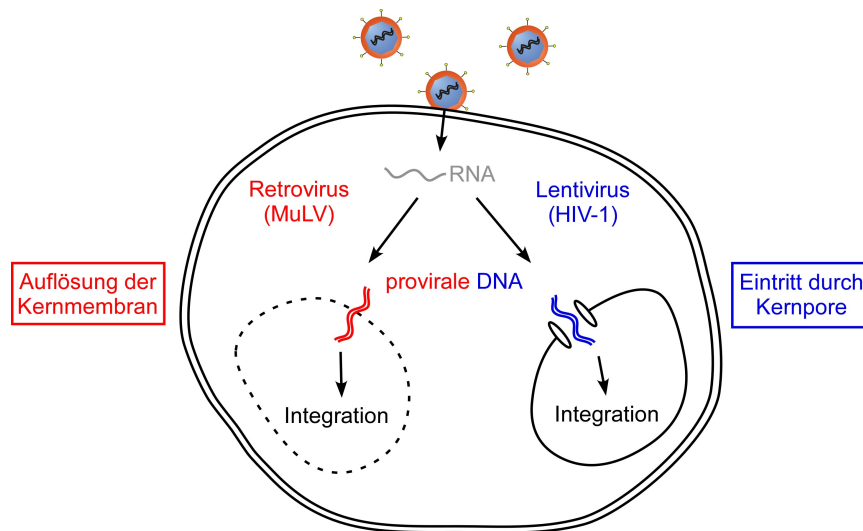


Abbildung 3. Unterschiede beim Eintritt viraler DNA in den Zellkern. Prototypische Retroviren (rot) können nur bei Auflösung der Kernmembran (Zellteilung) ins Wirts-Chromosom integrieren, während Lentiviren (blau) aktiv in den Zellkern transportiert werden.

Die akzessorischen Gene haben folgende Funktionen im Wildtyp-HIV: Die transaktivierende Wirkung der *tat*-Proteine (transactivator of transcription) wird durch die Bindung an das *TAR*-Element (trans-activation response) vermittelt. Die *rev*-Proteine (regulator of expression) sind eine Klasse von posttranskriptionell wirkenden Transaktivatoren. Sie binden an eine als *RRE* (*rev* response element) bezeichnete RNA-Sequenz und sind für die Genexpression während des Replikationszyklus verantwortlich (Desrosiers, 2001; Hirsch and Curran, 1996). Das

vif-Protein ist ein Bestandteil des Nucleoproteinkomplexes und beeinflusst die Infektiosität der freigesetzten Viren. Die Hauptfunktion des *vpr*-Proteins liegt vermutlich in seiner Mitwirkung am Transport des Präintegrationskomplexes (PIC) in den Zellkern. *Vpu* fördert vor allem in ruhenden Zellen die Freisetzung von Viren. Die Anwesenheit der *nef*-Proteine in den Vironen steigert ebenfalls die Infektiosität (Hirsch and Curran, 1996). Alle akzessorischen Gene sind zwar wichtige Virulenz-Faktoren für Wildtyp-HIV, jedoch für die *in vitro* Produktion infektiöser Partikel entbehrlich (siehe Kapitel 5.3) (Kim *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1997).

Für den Eintritt von Wildtyp-HIV in die Wirtszelle ist gp120 essentiell (Abbildung 4). Durch seine Bindung an CD4 (Berger *et al.*, 1999; Doms and Moore, 2000; Wyatt and Sodroski, 1998) erfährt es eine Konformationsänderung und die Korezeptor-Bindungsstelle wird zugänglich (Abbildung 4) (Rizzuto *et al.*, 1998). Die Bindung des Korezeptors (Chemokin-Rezeptoren CCR5 oder CXCR4) ermöglicht den Eintritt des Viruspartikels in die Zelle durch Fusion (Abbildung 4). Aus diesem Grund können Wildtyp-Lentiviren nur Zellen infizieren, die das CD4-Protein auf der Zelloberfläche tragen (Tropismus) (Berger *et al.*, 1999; Doms and Moore, 2000; Wyatt and Sodroski, 1998). Im Anschluß an die virale Infektion verursachen Lentiviren normalerweise einen langsamen und progressiven Krankheitsverlauf (lat.: *lentus* = langsam) (Lever *et al.*, 2004).

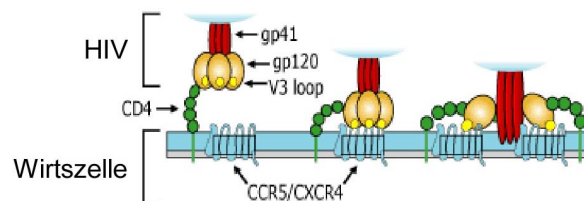


Abbildung 4. Eintritt des Wildtyp-HIV in die Wirtszelle durch Zellfusion, nach Bindung von Rezeptor und Korezeptor (Abbildung aus <http://hiv.net/2010/haart/entry2.htm>, modifiziert nach (Moore and Doms, 2003)).

5.2. Virale Vektoren

Das grundlegende Konzept zur Etablierung eines viralen Vektorsystems ist simpel (Pfeifer and Verma, 2001): (i) Identifizierung viraler Gene, die für Pathogenese, Replikation und Produktion infektiöser Partikel relevant sind. (ii) Deletion möglichst aller für die Pathogenese relevanten Gene und Inkorporation einer Transgen-Expressionskassette. (iii) Produktion viraler Partikel in Helfer-Zellen durch Expression essentieller viraler Proteine *in trans*.

5.3. Entwicklung lentiviraler Vektoren

Die schrittweise Umsetzung des in Kapitel 5.2 beschriebenen Konzeptes auf Lentiviren führte zur Aufteilung des viralen Genoms in Vektor und Verpackungs-Konstrukte. Lentivirale Vektor-Systeme (Abbildung 5) sind vielseitig einsetzbar und zeichnen sich vor allem durch ihre Fähigkeit nicht-teilende Zellen zu infizieren aus (Lever *et al.*, 2004).

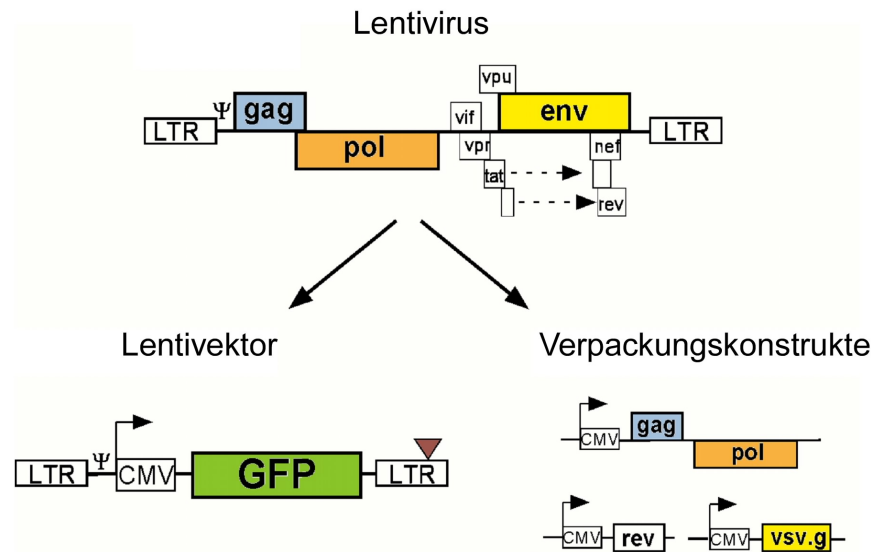


Abbildung 5. Schematische Darstellung eines Lentivirus am Beispiel von HIV-1 (oben) und eines davon abstammenden Vektor-Systems (unten). Das virale Genom wurde geteilt in Vektor (links) und Verpackungs-Konstrukte (rechts). CMV, Cytomegalovirus-Promoter; Dreieck, SIN-Mutation; env, Gen für Hüllenproteine; gag, Gen für gruppenspezifische Antigene; LTR, long terminal repeat; nef, akzessorisches Gen; pol, Gen für Enzymaktivitäten; Ψ, Verpackungssignal; rev und tat, regulatorische Gene; vif, vpr und vpu, akzessorische Gene; *VSV.G*, G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus.

Das native HIV-Hüllenprotein stellte einen limitierenden Faktor für die Nutzung von Lentiviren dar. Um den natürlichen Tropismus von Lentiviren (Abbildung 4) zu erhöhen, wurde *env* durch Hüllenproteine heterologer Viren ersetzt. Zur Pseudotypisierung wird am häufigsten das G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus (*VSV.G*) verwendet (Akkina *et al.*, 1996; McClure *et al.*, 1988; Naldini *et al.*, 1996). Diese Methode hat außerdem den Vorteil, daß die produzierten Virus-Partikel wesentlich stabiler sind als das native HI-Virus. *VSV.G*-pseudotypisierte Viruspartikel können mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden und sind auch gegenüber Einfrier- und Auftau-Prozessen resistenter (Lever *et al.*, 2004). Des weiteren verläuft der Eintritt des Virus-Partikels in die Wirts-Zelle mit *VSV.G* nicht mehr über Virus-Zellfusion sondern über den Endozytose-Signalweg (Aiken, 1997).

Um das Risiko der homologen Rekombination und damit der Produktion infektiöser Partikel zu reduzieren, wurden möglichst viele virale Elemente aus dem Verpackungs-System entfernt. Verschiedene HIV-Gene (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) haben wichtige Funktionen im viralen Lebenszyklus und sind relevant für die virale Pathogenese. Ihre Anwesenheit in Vektoren führte jedoch zu Bedenken bezüglich der Sicherheit dieser Systeme (Delenda, 2004). Daher war es wichtig zu zeigen, daß lentivirale Vektoren auch ohne die Anwesenheit dieser Gene effizient produziert werden können (Dull *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1997). Der Transaktivator *tat* ist für die effiziente Produktion lentiviraler Partikel entbehrlich und konnte durch starke heterologe Promoter-Sequenzen ersetzt werden (Dull *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Miyoshi *et al.*, 1998). Eine optimale Vektor-Produktion erfordert die Anwesenheit von *rev*, welches mit RRE interagiert und den nuklearen Export der ungespleißten *gag-pol* mRNA und der genomischen RNA des Transfervektors begünstigt (Delenda, 2004). Die Expression des *rev*-Gens durch ein separates Konstrukt konnte die Vektor-Sicherheit weiter erhöhen (Gasmi *et al.*, 1999).

Die Leistungsfähigkeit des Lentivektor-Systems hängt nicht nur von den Verpackungskonstrukten ab, sondern auch vom Transfervektor selbst. Das Genom des Transfervektors (Abbildung 6) beinhaltet alle *cis*-aktiven Sequenzen für Verpackung (ψ), reverse Transkription (LTRs), Integration (LTRs) und Transkription (5'-LTR oder interne heterologe Promotoren) sowie das Transgen von Interesse (Delenda, 2004).

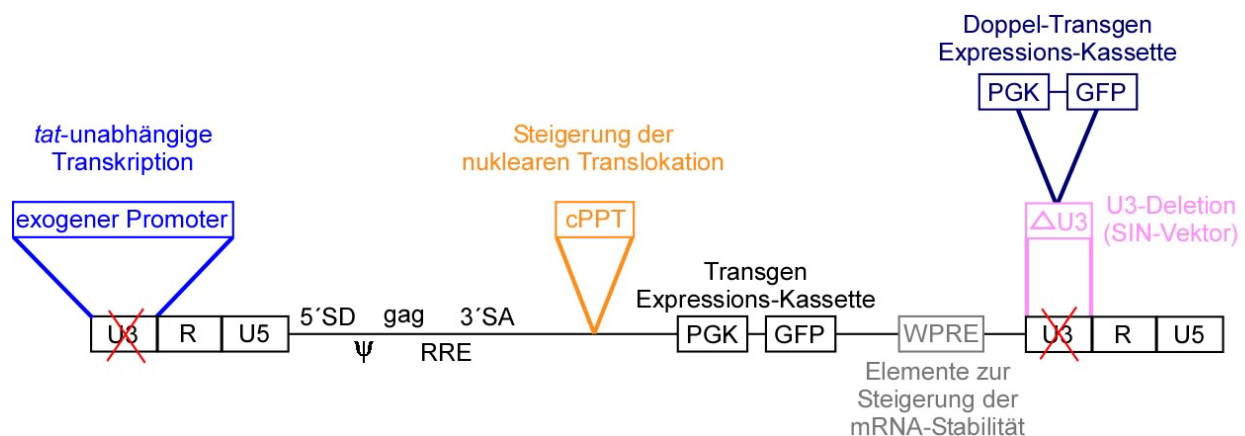


Abbildung 6. Schematische Darstellung der wesentlichen Elemente eines modernen lentiviralen Vektors. Grafik modifiziert nach (Delenda, 2004).

Um die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen, wurden außerdem regulatorische Sequenzen in den lentiviralen Transfervektor integriert. Zennou *et al.* konnten zeigen, daß das Einbringen

eines zentralen Polypurin-Traktes (cPPT) die nukleare Translokation des PIC fördert (Zennou *et al.*, 2001). Allerdings ist cPPT offenbar für den nuklearen Import viraler DNA nicht essentiell (Dvorin *et al.*, 2002; Limon *et al.*, 2002). Auch das Einfügen des posttranskriptionell regulatorischen Elements des Woodchuck Hepatitis-Virus (WPRE) führte zu einem substantiellen Anstieg der Transgen-Expression, unabhängig von der Art des Transgens oder des Promoters (Zufferey *et al.*, 1999).

Die LTRs der Vektor-Konstrukte wurden wie folgt modifiziert: Die U3-Region des 5'-LTRs wurde durch heterologe Promoter-Sequenzen ersetzt um eine *tat*-unabhängige Transkription in den Verpackungszellen zu erreichen (Abbildung 6). Ein wichtiger Aspekt lentiviraler Vektoren ist die potentielle Gefahr der Aktivierung von Proto-Onkogenen. Daher wurden Promoter- und Verstärker-Elemente aus der U3-Region des 3'-LTRs entfernt ($\Delta U3$) (Mut in Abbildung 7). Die $\Delta U3$ wird während der LTR-Konversion verdoppelt und an das 5' Ende des viralen Genoms kopiert (Abbildung 7). Daher besitzt das integrierte Provirus keine transkriptionelle Aktivität mehr im 5'-LTR. Solche LTR-inaktiven Vektoren werden auch als selbst-inaktivierende (SIN) Vektoren bezeichnet (Iwakuma *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1998; Miyoshi *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1998).

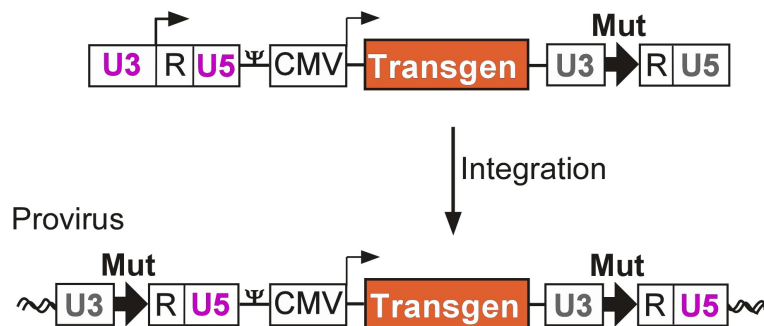


Abbildung 7. Schematische Darstellung eines lentiviralen SIN-Vektors vor (oben) und nach der Integration (unten). Während der Integration wird die SIN-Mutation in der 3' U3-Region ($\Delta U3$) nach 5' kopiert.

5.4. Transgene Tiere

Transgene Tiere haben eine herausragende Bedeutung für viele Bereiche der „Life Sciences“. Sie können für biologische und medizinische Grundlagenforschung, aber auch für landwirtschaftliche Studien eingesetzt werden. Ganz allgemein werden transgene Tiere definiert als Tiere, die aufgrund menschlicher Intervention rekombinante DNA in ihrem Genom tragen (Wall, 1996). Durch das Einbringen eines Transgens in das Genom von Tieren können Gene überexprimiert

werden. Anhand dieser „gain-of-function“ Modelle kann die Funktion von Genen *in vivo* untersucht werden. Die transgene Technologie erlaubt die Untersuchung der Genfunktion in bestimmten Organen, aber auch zu definierten Zeitpunkten, z.B. um den Einfluß bestimmter Gene auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien und die Organogenese zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Technologie können aber auch spezifische Mutationen in transgene Tiere eingeführt werden, um zum Beispiel Tiermodelle genetischer Erkrankungen des Menschen zu erzeugen. Das Spektrum transgener Tiere ist dabei nicht auf Labortiere, wie z.B. Mäuse, Ratten und andere kleine Säugetiere begrenzt. Es können auch Transgene in große Nutztiere eingebracht werden, um z.B. transgene Schweine und Rinder zu erzeugen.

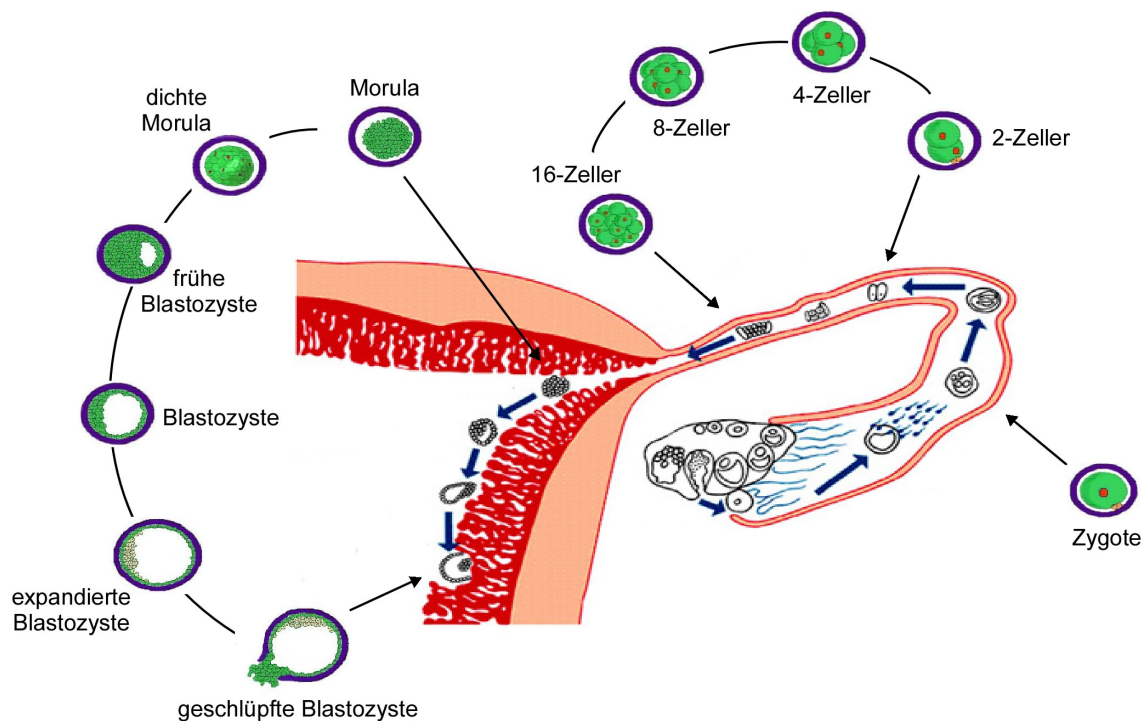


Abbildung 8. Schematische Übersicht der Embryonalentwicklung, von der Zygote bis zur Implantation der geschlüpfen Blastozyste. (Abbildung modifiziert nach (McGraw-Hill, 1997)).

Für die Erzeugung transgener Tiere ist der Zeitpunkt des Gentransfers ein wichtiger Parameter. Um eine gleichmäßige Verteilung des Transgens im Organismus zu erzielen, muß der Gentransfer zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der embryonalen Entwicklung erfolgen. Für den Gentransfer können nur Präimplantationsembryonen verwendet werden, also solche Embryonen, die sich noch nicht in die Uterusschleimhaut eingenistet (implantiert) haben. Abbildung 8 zeigt schematisch die Entwicklungsstadien von Säugetierembryonen und das Einnisten in den Uterus. Idealerweise werden Embryonen kurz nach der Befruchtung (Zygoten) für

die Erzeugung transgener Säugetiere eingesetzt. Als F0-Generation (Founder-Tiere) bezeichnet man transgene Tiere, die sich aus den Gen-manipulierten Embryonen entwickelt haben. Trägt die F0-Generation das Transgen auch in den Keimbahnzellen, kann es an die Nachkommen weitergeben werden (Keimbahntransmission). Die direkten Nachkommen der F0-Generation bezeichnet man als F1-Generation. Diese Tiere tragen das eingebrachte Transgen nun in allen Zellen ihres Körpers.

5.4.1. Historische Entwicklung der transgenen Technologie

Die ersten transgenen Tiere wurden vor mehr als 30 Jahren von Rudolf Jaenisch und Beatrice Mintz (Jaenisch and Mintz, 1974) erzeugt. Das genetische Material wurde in diesen initialen Versuchen durch Mikroinjektion von DNA des simian virus 40 (SV40) in den Hohlraum von Mäuseembryonen (Blastocoel, Abbildung 9) transferiert. Jaenisch und Mintz konnten zeigen, daß die daraus resultierenden Mäuse (F0-Generation) tatsächlich die SV40-DNA in mehreren Geweben trugen (Jaenisch and Mintz, 1974). Allerdings wurde in diesen ersten Experimenten die Keimbahntransmission nicht untersucht und die so erzeugten Mäuse zeigten einen ausgeprägten Mosaicismus (Siehe Kapitel 8.1.4).

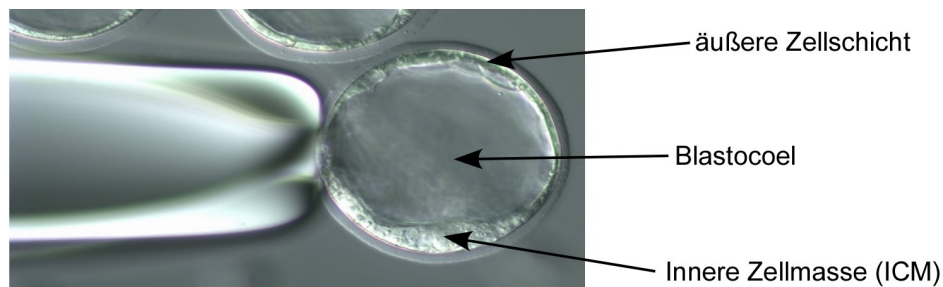


Abbildung 9. Darstellung einer Maus-Blastozyste (Tag-4), die durch eine Haltekapillare (links) fixiert ist. Die äußere Zellschicht, innere Zellmasse (ICM) und die Blastozysten-Höhle (Blastocoel) sind gekennzeichnet. (Bild aus http://www.ohsu.edu/research/transgenics/slide_show/slide5.html).

Um eine Integration der viralen DNA sicherzustellen, wurden in weiteren Studien Mausembryonen direkt mit MuLV infiziert (Jaenisch, 1976). Tatsächlich konnte auf diesem Weg zum ersten Mal eine Keimbahntransmission von viraler DNA gezeigt werden. Die Proviren wurden nach den Mendel'schen Regeln an die F1-Tiere vererbt, wodurch die ersten transgenen Linien erzeugt wurden (Jaenisch, 1976). Die Infektion von Mausembryonen mit MuLV erwies sich als effizienter Weg des Gentransfers. Die Zona Pelluzida, die den Embryo umgibt, stellte jedoch eine natürliche

Barriere für die virale Infektion von Embryonen dar (Abbildung 10). Nach dem Entfernen dieser Schutzhülle (Abbildung 10) konnten die Embryonen durch Inkubation mit konzentrierter Viruslösung infiziert werden (Jaenisch, 1976). Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung von MuLV war, daß die virale DNA in das Wirtsgenom integriert (siehe Abbildung 3) und somit während der folgenden Zellteilungen an die Tochterzellen weitergegeben wurde.

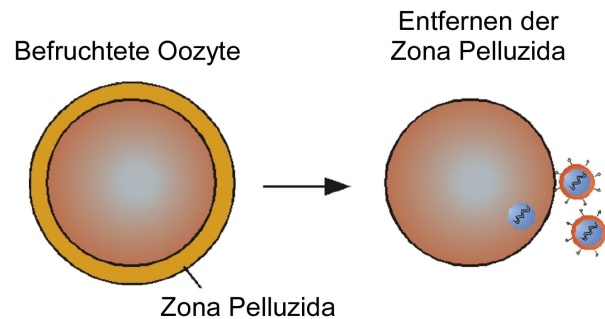


Abbildung 10. Denudieren eines Embryos, schematische Darstellung. Die Zona Pelluzida wird entfernt und der "nackte" Embryo in Virus-Suspension inkubiert.

5.4.2. Transkriptionelles Silencing

Der große Nachteil der retroviralen Transgenese ist jedoch, daß die Expression der retroviralen Gene während der frühen embryonalen Entwicklung, bzw. der Differenzierung von Zellen, abgeschaltet wird (Speers *et al.*, 1980; Teich *et al.*, 1977). Bei der Untersuchung retroviral transgener Mäuse (F0- und F1-Generation) zeigte sich, daß die eingebrachten Transgene nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert wurden (Jahner *et al.*, 1982). In etwa 25% der untersuchten Proviren konnten signifikante Deletionen festgestellt werden. Jedoch auch die intakten Retroviren zeigten keine oder nur sehr geringe Mengen spezifischer Transkripte (mRNA). Die Expression von Retroviren und retroviraler Vektoren wurde also auf Ebene der Transkription von DNA in mRNA abgeschaltet (Jahner and Jaenisch, 1980). Dieser Vorgang wird als transkriptionelles „gene silencing“ bezeichnet. Die weitere Analyse der abgeschalteten (gesilenceten) Proviren zeigte *de-novo* Hypermethylierung von CpG-Nukleotiden innerhalb der Transgene bzw. der viralen Sequenz (Jahner *et al.*, 1982; Laker *et al.*, 1998).

DNA-Methylierung ist eine der am besten untersuchten epigenetischen Regulations-Mechanismen und findet in Säugetieren und anderen Vertebraten hauptsächlich am Dinukleotid CpG statt (Bestor, 2000; Bird and Wolffe, 1999; Jones and Takai, 2001; Robertson and Wolffe,

2000). Während der embryonalen Entwicklung laufen Methylierungs- und Demethylierungs-Prozesse ab, in die viele verschiedene Enzyme involviert sind (Review in (Reik *et al.*, 2001)). Zwei dieser Enzyme (Dnmt3a und Dnmt3b) sind vermutlich verantwortlich für die *de-novo* Methylierung der retroviralen Genome (Okano *et al.*, 1999). Methylierte DNA wird von Methylbindenden Proteinen erkannt. Dazu gehört das Methyl-CpG bindende Protein 2 (MeCP2), welches Histon-Deacetylasen (HDACs) binden kann. HDACs sind in der Lage Acetylgruppen von Histon-Resten zu entfernen, wodurch Heterochromatin entsteht (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). Auf diese Weise wird letztlich die Cytosin-Methylierung mit einem Remodelling des Chromatins verknüpft (Nan *et al.*, 1998).

5.4.3. DNA-Mikroinjektion

Aufgrund des epigenetischen Silencings der retroviralen Transgene wurde die DNA-Mikroinjektion (DNA-MI) entwickelt (Abbildung 11). Bei der DNA-MI wird mittels einer Glaskapillare doppelsträngige DNA (cDNA) direkt in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle injiziert (Abbildung 11). In der pronuklearen Phase, kurz nach dem Eintritt des Spermiums in die Eizelle, sind der weibliche und der männliche Vorkern als individuelle Strukturen unter dem Mikroskop deutlich sichtbar (in der Spezies Maus). Das Cytoplasma von Zygoten höherer Säugetiere (Schweine und Rinder) ist im Gegensatz zu Maus-Embryonen nicht durchsichtig, so daß die Vorkerne nur schwer zu erkennen sind. Nach dem Einbringen der Transgen-DNA erfolgt die zufällige Integration ins Chromosom. Diese findet vor allem als Mehrfach-Integration (mehrere Kopien an verschiedenen Orten, besonders aber auch als Konkatermer) statt (Brinster *et al.*, 1981; Brinster *et al.*, 1985). Der erste sichtbare Phänotyp einer transgenen Maus wurde 1982 beschrieben (Palmiter *et al.*, 1982). Zur Zeit ist die DNA-MI die am häufigsten verwendete Methode zur Erzeugung transgener Tiere, insbesondere transgener Mäuse.

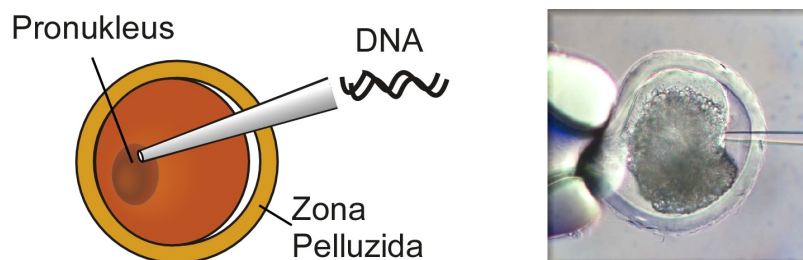


Abbildung 11. DNA-Mikroinjektion. Schematische Darstellung einer Zygote (umgeben von der Zona Pelluzida), der Injektionskapillare und des Pronukleus (links). Entsprechendes Foto einer Schweine-Zygote (rechts).

5.4.4. Lentivirale Transgenese in Mäusen

Initiale Versuche das Silencing prototypischer Retroviren durch Mutationen der LTRs zu verhindern, waren nicht erfolgreich. Ein Durchbruch für die virale Transgenese konnte erst durch die Verwendung lentiviraler Vektoren erreicht werden. 2002 wurden die ersten transgenen Nagetiere (Mäuse und Ratten) durch Infektion von Präimplantationsembryonen mit lentiviralen SIN-Vektoren erzeugt (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). In den durch lentiviralen Gentransfer erzeugten Tieren wurde das Transgen stabil exprimiert und über die Keimbahn an die nächste Generation weitergegeben (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Die Anzahl der transgenen Tiere pro behandeltem Embryo (Transgenese-Rate) war erheblich höher als bei der DNA-MI (8fache Steigerung) (Review in (Pfeifer, 2004)).

5.4.5. Transgene Nutztiere

Die Produktion von pharmakologisch relevanten Proteinen in Rindern, Schafen und Schweinen ("gene farming") hat mehrere Vorteile gegenüber anderen Systemen: Produktion in großem Maßstab, korrekte Glykolylierungs-Muster und posttranslationale Modifikationen sowie geringe Produktionskosten (Rudolph, 1999). Obwohl hierzu die gängigste Methode die Aufreinigung von Milch ist, konnten auch aus anderen Körperflüssigkeiten rekombinante Proteine gewonnen werden (Dyck *et al.*, 2003).

Eine weitere potentielle Anwendung findet sich in der Transplantationsmedizin. Derzeit warten in Deutschland etwa 11.500 Patientinnen und Patienten auf ein Spenderorgan. Schweine scheinen von ihrer Anatomie und Physiologie von allen Tieren am besten geeignet, um den Organmangel zumindest teilweise zu beheben. Die Übertragung von lebens- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden (einschließlich ganzer Organe oder Körperteile) zwischen verschiedenen Spezies nennt man Xenotransplantation. Die Transplantation von Schweineorganen auf den Menschen würde jedoch Abstoßungsreaktionen verursachen (Abbildung 12). Die Expression immunmodulatorischer Gene in Schweinen wäre ein Weg für den Einsatz von Schweine-Organen in der Transplantationsmedizin. Humane, komplementregulatorische Proteine konnten bereits erfolgreich in transgenen Schweinen exprimiert werden, was nach der Organtransplantation in Affen zu einer Verzögerung der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) führte (Niemann and Kues, 2003).

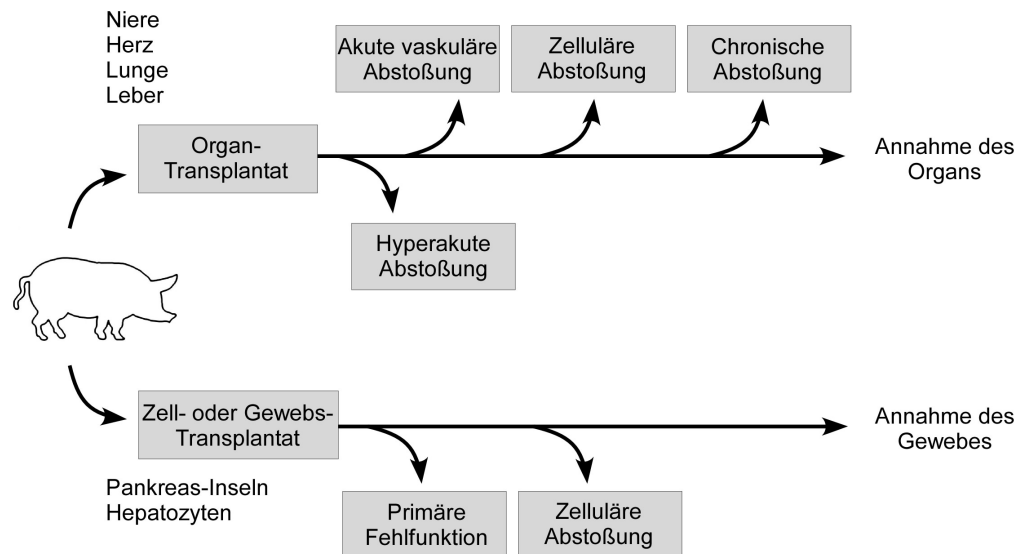


Abbildung 12. Xenotransplantation. Übersicht der vorhandenen Abstoßungs-Mechanismen, die für eine erfolgreiche Transplantation von Schweine-Organen (oben) oder -Geweben (unten) in den Menschen überwunden werden müssten. Grafik modifiziert nach (Platt, 2002).

Aufgrund der bereits angesprochenen Ähnlichkeiten zum Menschen wären Schweine auch als Modelle für menschliche Erkrankungen geeignet. Wegen der großen anatomischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch können viele wichtige menschliche Erkrankungen in transgenen Mäusen nicht optimal untersucht werden. Die zystische Fibrose ist nur ein Beispiel hierfür (Review in (Prather *et al.*, 2003)).

Die Entwicklung der molekularen Genetik in den vergangenen Jahrzehnten machte es möglich, komplexe Regulationsmechanismen wie zum Beispiel Leistungs- und Gesundheits-Merkmale von Tieren zu beeinflussen (Wolf, 2005). Bestimmte Sequenzen innerhalb des Genoms können quantitative Merkmale wie zum Beispiel Milch- und Fleischleistung beeinflussen (Wolf, 2005). Daher ist eine weitere potentielle Anwendung für transgene Nutztiere die Verbesserung der landwirtschaftlich genutzten Rassen im Hinblick auf Wachstumsraten, Krankheitsresistenzen und Zahl der Nachkommen (Wheeler, 2003).

Die DNA-MI liefert zwar auch in höheren Säugetieren transgene Nachkommen, ist jedoch mit erheblichen Nachteilen behaftet: Zufällige Integration des Transgens und variable Expressions-Level in transgenen Nachkommen (Niemann and Kues, 2003). Das Hauptproblem ist jedoch die geringe Effizienz des Verfahrens (<1% transgene Nachkommen) (Wall, 1996). Hohe Produktionskosten und der enorme Zeitaufwand sind die limitierenden Faktoren für Anwendungen in großem Maßstab. Die Entwicklung eines hocheffizienten Verfahrens würde deshalb die entstehenden Kosten rapide senken. Ein solches Verfahren müsste sich demzufolge durch 2

Eigenschaften auszeichnen: (i) Die Transgenese-Rate bei der initialen Erzeugung transgener Founder müßte möglichst hoch sein. (ii) Die erzeugten Tieren sollten einen möglichst geringen Grad an Mosaicismus oder Chimärismus aufweisen. Zum einen könnten sie dadurch direkt für die gewünschte Anwendung verwendet werden und müßten nicht erst zu transgenen Tieren (F1) verpaart werden. Zum anderen würden solche Tiere mit hoher Wahrscheinlichkeit transgene Nachkommen liefern.

6. Zielstellung der Arbeit

Transgene Nutztiere sind von großem Interesse für die molekulare Medizin, Biotechnologie und viele Bereiche der Life Sciences. Den potentiellen Anwendungsmöglichkeiten stand bisher jedoch die geringe Effizienz und die damit verbundenen enormen Produktions-Kosten entgegen. Lentivirale Transgenese wurde bereits erfolgreich zur Erzeugung transgener Mäuse und Ratten eingesetzt. Eine frühere Studie über lentivirale Infektion von Affen-Embryonen zeigte allerdings nur Gentransfer in extraembryonale Gewebe (Plazenta). Es konnten keine transgenen Affen erzeugt werden (Wolfgang *et al.*, 2001). Deshalb war unklar, ob lentivirale Transgenese auch in höheren Säugetieren anwendbar ist.

Ziel war es, ein effizientes und damit kostengünstiges Verfahren zu entwickeln, um transgene Schweine und Rinder zu erzeugen. In diesem Rahmen sollten in beiden Spezies die optimalen Bedingungen für die Infektion von Embryonen untersucht werden. Des weiteren sollten die vier wichtigsten Parameter für die Produktion transgener Tieren sichergestellt werden: (i) hohe Transgenese-Raten, (ii) geringer Grad an Mosaicismus innerhalb der Tiere, (iii) hohe Transgen-Expression und (iv) Keimbahntransmission des Transgens. Während die Transgenese-Rate vor allem vom Virus-Titer anhängt, hat der Infektionszeitpunkt großen Einfluß auf das Expressions-Muster. Die lentivirale Infektion sollte zu einem möglichst frühen Stadium in der embryonalen Entwicklung stattfinden. Bei der Untersuchung der erzeugten Tiere stand der Nachweis der integrierten Proviren im Wirtschromosom sowie deren Verteilung und Expression in unterschiedlichen Organen im Vordergrund. Die Keimbahntransmission der Transgene ist wichtig für die Erzeugung, Aufrechterhaltung und Modifikation transgener Linien. Um dies zu analysieren, sollten transgene Founder verpaart und die Nachkommen ebenfalls detailliert untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Wahl von Promotoren zur Steuerung der Transgen-Expression in höheren Säugetieren. Hier sollte vor allem die Funktion eines Gewebe-spezifischen Promoters im Vergleich zu einem ubiquitär exprimierenden Promoter untersucht werden.

Das epigenetische Silencing von Retroviren war bisher der limitierende Faktor für den Einsatz retroviraler Vektoren bei der Erzeugung transgener Tiere (Review in (Ellis and Yao, 2005)). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob lentivirale Vektoren in höheren Säugetieren auch durch epigenetische Regulationsmechanismen beeinflusst werden. Hierfür mußten zunächst F1-Schweine mit Einzel-Integranen durch Verpaarung transgener

Founder erzeugt werden. In diesen sollte die Transgen-Expression verschiedener lentiviraler Integranen verglichen und eventuelle Unterschiede genau charakterisiert werden.

7. Material und Methoden

Falls nicht anders erwähnt, wurden für alle Versuche Chemikalien und Lösungen von höchster Reinheit und molekularbiologischer Qualität verwendet (Roth, Merck, Sigma und VWR). Zellkulturschalen, Einweg-Pipetten und sonstige Verbrauchsmaterialien für Zellkultur oder molekularbiologisches Arbeiten lieferten die Firmen VWR und Sarstedt. Für die Herstellung wässriger Lösungen wurde sterilfiltriertes Wasser (EASYpure UV/UF Anlage, WeteA Wilhelm Werner GmbH) verwendet.

7.1. Lentiviren

7.1.1. Virus-Plasmide

Die ursprünglichen Virus-Plasmide stammen aus dem Labor von Inder Verma (The Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics, La Jolla, CA, USA).

pMDLg/pRRE:

Das Verpackungs-Konstrukt pMDLg/pRRE (Abbildung 5 und Kapitel 11.1) exprimiert, angetrieben durch einen Cytomegalovirus (CMV) Promoter, die *gag*- und *pol*-Gene des Wildtyp-HIV sowie das Polyadenylierungs-Signal des humanen β -Globin Gens. Da das Transkript der *gag*- und *pol*-Gene *cis*-repressive Sequenzen enthält, werden diese nur exprimiert, wenn Rev durch die Bindung an RRE (Rev Response Element) den Transport der viralen mRNA aus dem Zellkern ermöglicht. Alle viralen Sequenzen 5' vom *gag*-Startcodon, einschließlich der *tat*- und *rev*-Exone, wurden ersetzt (Dull *et al.*, 1998).

RSV-Rev:

Das nichtüberlappende RSV-Rev Konstrukt (Abbildung 5 und Kapitel 11.1) exprimiert die *rev*-cDNA (Dull *et al.*, 1998).

pMD.G:

Das pMD.G Plasmid (Abbildung 5 und Kapitel 11.1) codiert für ein heterologes Hüllenprotein, um den Virusvektor zu pseudotypisieren. Es exprimiert *VSV.G*, angetrieben durch den CMV-Promoter (Dull *et al.*, 1998).

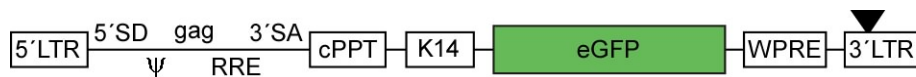
pRRL.SIN-18:

Das Vektor-Konstrukt pRRL.SIN-18 (Abbildung 5 und Kapitel 11.1) enthält Sequenzen von HIV-1 und die Expressions-Kassette für das Transgen. Es repräsentiert den Teil des lentiviralen Gentransfer-Systems, der in die DNA der Zielzelle oder des Zielorganismus integriert wird. Es enthält keine Wildtyp-Kopien der HIV-LTRs: Das 5' LTR ist chimär und enthält Verstärker und Promoter des RSV (Respiratory Syncytial Virus) anstelle der U3-Region des Wildtyp-HIV (RRL). Im 3' LTR wurde die U3-Region nahezu vollständig deletiert, einschließlich der TATA-Box (von Nukleotid -418 bis -18 relativ zur U3/R Grenze). Da die 3' U3-Region innerhalb des Virus-Lebenszyklus als Template für die Erzeugung beider Kopien der LTRs verwendet wird, führt eine Deletion dieser 3' U3-Region zu einer transkriptionellen Inaktivierung beider LTRs (SIN-Vektor) (Dull *et al.*, 1998).

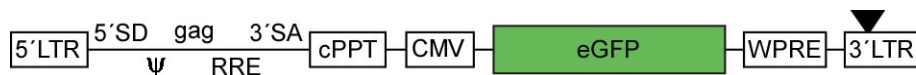
LV-PGK:



LV-K14:



LV-CMV:



PGK-TAg:



Abbildung 13. Verwendete Transfer-Konstrukte. Dreieck, SIN Mutation; cPPT, zentraler Polypurin-Trakt; WPRE, Woodchuck Hepatitis Virus posttranskriptionell regulatorisches Element, PGK, Phosphoglycerat-Kinase Promoter; K14, Keratin-14 Promoter; CMV, Cytomegalovirus Promoter; TAg, Large Tumor Antigen.

Für alle Versuche wurde ein SIN-Vektorkonstrukt verwendet (Follenzi *et al.*, 2000), welches eGFP (enhanced GFP) als Reporter unter der Kontrolle eines ubiquitär exprimierenden Promoters trug. Hierfür wurde der Phosphoglycerat-Kinase (PGK) (Michelson *et al.*, 1983; Singer-Sam *et al.*, 1983; Yang *et al.*, 1988) gewählt (LV-PGK, Abbildung 13). Zur Untersuchung der Gewebe-spezifischen Transgen-Expression lentiviraler Vektoren (Zielorgan Haut) wurde der PGK-Promoter durch den humanen Keratin-14 Promoter (LV-K14, Abbildung 13) ersetzt. LV-CMV (Abbildung 13), mit dem ubiquitär exprimierenden CMV-Promoter, wurde für Zellversuche zum Test der Spezifität des K14-Promoters verwendet. Zum Immortalisieren von primären Haut-Fibroblasten wurden diese mit Lentiviren infiziert, die das Large Tumor Antigen (TAg) des SV40 exprimierten (PGK-TAg, Abbildung 13) (Salmon *et al.*, 2000).

7.1.2. Virusplasmid-Maxipräparation

Zur Vermehrung und Gewinnung der Virus-Plasmide wurde als Wirtsorganismus der *E. coli* Stamm XL-1 blue MRF (Stratagene) verwendet. Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem Medium Ampicillin in einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Aus einer 5ml Vorkultur (Luria-Bertani-Medium, LB⁺) wurde nach 6-8 Stunden ein 100ml-Ansatz angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag bei 5000 rpm in einer Großzentrifuge (J2-MC mit JLA 10.500 Rotor; Beckman&Coulter) abzentrifugiert und das Bakterienpellet nach der Anleitung des Herstellers mit einem Endotoxin-freien NucleoBond[®] PC 500 EF Kit (MACHEREY-Nagel) präpariert.

LB⁺ Medium:

10g	Pepton	1g	Glucose
5g	Hefeextrakt	ad 1L H ₂ O	
5g	NaCl	pH 7,2-7,5	

7.1.3. Produktion rekombinanter Lentiviren

12 x 15cm Platten (Falcon) wurden für 15 Minuten mit je 10ml Poly-L-Lysin Lösung (50ml in 500ml PBS gelöst) inkubiert. Anschließend wurden HEK293T Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM (4500 mg/L Glukose, ohne Pyruvat, Gibco) supplementiert mit 10%

fetalem Kälber-Serum (FKS; Biochrom AG) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin, Biochrom AG)] ausgestreut. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37°C und 10% CO₂. Zur Transfektion der Virus-Plasmide am darauffolgenden Tag sollten die Zellen nicht mehr als 60% konfluent sein.

Der Transfektions-Mix (Vektor, pMDLg/pRRE, RSV-Rev, pMD.G und CaCl₂) wurde in ein steriles Röhrchen pipettiert (CaCl₂ wurde als letztes zugegeben) und gemischt. Anschließend wurde die gleiche Menge 2xBBS tropfenweise zugegeben und - durch 5maliges invertieren des Röhrchens - gemischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurde der Mix auf die Platten tropfenweise verteilt und mit dem Medium vermischt. Die Transfektion findet bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 3% über Nacht statt.

<u>PBS:</u>		<u>2x BBS:</u>	
40g	NaCl	4,26g	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES)
1g	KCl		
7,2g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	6,54g	NaCl
1,2g	KH ₂ PO ₄	0,085g	Na ₂ HPO ₄
pH 7,4		pH 6,95	
ad 5L H ₂ O		ad 400ml H ₂ O	

Am darauffolgenden Tag wurde morgens das plasmidhaltige Medium entfernt, frisches Medium zugegeben und die Zellen wurden bei 10% CO₂-Gehalt bis zum darauffolgenden Tag inkubiert.

Das virushaltige Medium wurde am nächsten Morgen abgenommen und zur Abtrennung von Zellen und Zell-Debris mit einem Tensid-freien Cellulose-Acetat Filter (SFCA, 0,45µm) filtriert (Nalgene). Die Zellen wurden mit frischem Medium versetzt und bis zur 2. Ernte wieder bei 10% CO₂ inkubiert. Das Filtrat wurde in Zentrifugenröhrchen (Beckman&Coulter) in einer Ultrazentrifuge (Optima LE-80K mit SW28 Rotor; Beckman&Coulter) 2 Stunden bei 17°C aufkonzentriert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Viruspellets in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) resuspendiert. Die Suspensionen wurde in einem sterilen Schraub-Reaktionsgefäß vereinigt und bei 4°C bis zur 2. Ernte gelagert.

24 Stunden nach der 1. Ernte wurde das Medium erneut filtriert, analog zur 1. Ernte aufkonzentriert und mit der Suspension der 1. Ernte vereinigt. In einem Zentrifugenröhrchen (Beckman&Coulter) wurde 20%ige Sukrose mit der vor-konzentrierten Virusernte vermischt und

in einem SW55 Rotor (Beckman&Coulter) bei 17°C für 2 Stunden pelletiert. Das Virus-Pellet wurde in HBSS resuspendiert, in ein steriles Schraub-Reaktionsgefäß überführt und in einem Schüttler bei 1400 rpm gemischt. Nach kurzer Zentrifugation (3s bei 13000 rpm) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) wurde der trübe Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

7.1.4. Bestimmung des Virus-Titers

Lentivirale Vektoren, die eGFP als Reportergen tragen, können durch Infektion von Zellen und anschließende Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analyse getitert werden. 100.000 HEK293T Zellen wurden auf eine 24-well Platte gesplittet und adhärten über einen Zeitraum von 4-6 Stunden. Ein μ l Lentivirus wurde in 330 μ l DMEM gelöst (Verdünnungsstufe 1). 30 μ l der Verdünnungsstufe 1 wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 300 μ l DMEM überführt und erneut gemischt (Verdünnungsstufe 2). Auf die gleiche Weise wurden noch weitere Verdünnungen hergestellt. Die einzelnen Verdünnungen wurden im 300 μ l Volumen über Nacht auf die Zellen gegeben. Nach 72 Stunden wurden die zu untersuchenden Zellen abtrypsinisiert und für 15 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA, in PBS gelöst) fixiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 1100 rpm wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mittels FACSScan (Becton Dickinson) untersucht. 10000 Zellen pro Probe wurden ausgezählt und bei λ_{em} 530 nm (grüne Fluoreszenz, FL-1) nach Anregung mit einem Argon-Laser (488nm) evaluiert. Über den prozentualen Anteil der infizierten Zellen kann - unter Einbeziehung der Verdünnungsstufe und der Anzahl der Zellen zum Infektionszeitpunkt - der Titer des Virus bestimmt werden (Infektiöse Einheiten pro ml Virus, IU). Der Virus-Titer von LV-PGK betrug $\sim 1 \times 10^9$ IU/ml, der von LV-K14 $\sim 2,5 \times 10^8$ IU/ml.

FACS-Puffer:

8,12g	NaCl	0,43g	LiCl
0,26g	KH ₂ PO ₄	0,20g	Na-Azid
2,35g	Na ₂ HPO ₄	ad 1L H ₂ O	
0,28g	KCl	pH 7,37	
0,36g	Na ₂ EDTA		

Multiplicity of Integration (MOI) = $-\ln(\text{prozentualer Anteil der nicht-infizierten Zellen})$

Virus-Titer = $(\text{Anzahl Zellen bei Infektion}) \cdot (\text{MOI}) \cdot (\text{Verdünnungsfaktor}) \cdot 1000 \text{ [IU/ml]}$

7.2. Erzeugung transgener Tiere

Die Haltung und Zucht der Tiere sowie die Embryonaltransfers in Schweine und Rinder wurden am Lehrstuhl für molekulare Tierzucht der LMU München durchgeführt.

7.2.1. Transgene Schweine

Jungsauen im Alter von 6 Monaten wurden mit 1200 Injektionseinheiten (IE) Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG; Intergonan[®], Intervet) superovuliert. Die Ovulation wurde zusätzlich durch Gabe von 750 IE Human Chorionic Gonadotropin (HCG; Ovogest[®], Intervet) drei Tage später stimuliert. In den nachfolgenden 24 bis 36 Stunden wurden die Spender-Tiere 2 mal künstlich befruchtet und 36 Stunden nach der ersten Besamung geschlachtet. Die Uteri wurden entnommen, die Eileiter freipräpariert und mit 20ml Spüllösung [PBS, supplementiert mit 5% hitze-inaktiviertem Lammserum (hiLS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 50 mg Gentamicin-Sulfat] gespült. Die befruchteten Eizellen (Zygoten) wurden herausgesucht und in PBS-Tropfen, supplementiert mit 20% hiLS, bei 39°C abgedunkelt aufbewahrt. Die Virusinjektion wurde unter einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit Hilfe mechanischer Mikromanipulatoren (Haltepipette und Injektions-Kapillare, Leika) durchgeführt. Konzentrierte Virus-Lösung (LV-PGK und LV-K14) wurde unter die Zona Pelluzida, in den perivitellinen Raum (ca. 100 pico-Liter) injiziert. (Die hormonelle Behandlung der Schweine, die Gewinnung der Zygoten und die subzonale Injektion lentiviraler Vektoren wurden durchgeführt von Barbara Kessler, Tamara Holy und Christian Erdle, Lehrstuhl für molekulare Tierzucht, LMU München).

Als Empfänger wurden Jungsauen im Alter von 6-7 Monaten verwendet. Diese wurden durch orale Gabe von Altrenogest (Regumate[®], Serum-Werk Bernburg AG) über einen Zeitraum von 15 Tagen und anschließende Verabreichung von 750 IE PMSG synchronisiert. Die Ovulation wurde 3 Tage später durch 750 IE HCG induziert. Der Embryotransfer wurde unter Vollnarkose [1.2 ml/10 kg Ketamin-Hydrochlorid (Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg) und 0.5 ml/10 kg Xylazin (WDT, Germany) intravenös verabreicht] durchgeführt. Pro Empfänger wurden 27-58 injizierte bzw. Kontrollembryonen in die Eileiter transferiert. Nach einer durchschnittlichen

Trächtigkeitsdauer von 114 Tagen wurden die Ferkel auf natürliche Weise geboren. (Die Embryonaltransfers wurden durchgeführt von Barbara Kessler und Sonja Ewerling, Lehrstuhl für molekulare Tierzucht, LMU München).

7.2.2. Transgene Rinder

Bovine Kumulus/Oozyten Komplexe (COCs) wurden in modifiziertem TCM 199 Medium (Invitrogen) für 22 Stunden bei 39°C in 5% CO₂ maturiert (Stojkovic *et al.*, 2001). Nach der Reifung wurde nach 2 verschiedenen Methoden weiterverfahren: 1.) COCs wurden mit Sperma (10⁶ Spermatozoen/ml) für 18 Stunden kokultiviert (*in vitro* Fertilisation, IVF), die vermeintlichen Zygoten von den Kumulus-Zellen befreit und die Lentivirus-Lösung (LV-PGK) subzonal in den perivitellinen Raum injiziert (Zygoten-Injektion). 2.) Die Oozyten wurden von den Kumulus-Zellen befreit und vor der IVF mit der Lentivirus-Lösung (LV-PGK) subzonal injiziert. Anschließend wurden die Oozyten wie oben beschrieben befruchtet (Oozyten-Injektion). Nach durchgeführter Virus-Injektion und Befruchtung wurden die Zygoten bis zum Blastozysten-Stadium (Tag 7) kultiviert (Stojkovic *et al.*, 2001). (Die hormonelle Behandlung der Rinder und die Gewinnung der Oozyten und Zygoten wurden durchgeführt von Hendrik Wenigerkind und Myriam Weppert, Lehrstuhl für molekulare Tierzucht, LMU München).

Infektion boviner Fibroblasten:

Bovine Fibroblasten wurden auf einer 6-well Platte ausgestreut und in 3ml DMEM (supplementiert mit 10% FKS und 1% Pen/Strep) kultiviert. Bei ~30% Konfluenz wurden die Zellen über Nacht in einem finalen Volumen von 800µl mit LV-PGK infiziert. Die Anzahl der eGFP positiven Zellen wurde durch FACScan Analyse (Becton Dickinson) bestimmt.

Kern-Transfer (NT):

Transfer der Fibroblasten in entkernte Eizellen wurde nach einem Standard-Protokoll durchgeführt (Zakhartchenko *et al.*, 1999). (Die Kerntransfers wurden durchgeführt von Valeri Zakhartchenko und Feikun Yang, Lehrstuhl für molekulare Tierzucht, LMU München).

Embryo Transfer:

Deutschen Fleckvieh Kälbern im Alter von 18-24 Monaten wurden 500 µg Cloprostenol (Estrumate[®]; Essex Tierarznei) intramuskulär verabreicht. Sieben Tage später wurden eins bis zwei Blastozysten (nach lentiviraler Oozyten-/Zygoten-Injektion oder nach NT) übertragen. (Die Embryotransfers wurden durchgeführt von Hendrik Wenigerkind und Myriam Weppert, Lehrstuhl für molekulare Tierzucht, LMU München).

7.3. In vivo Fluoreszenz-Imaging

Die grüne Fluoreszenz von eGFP wurde am lebenden Tier mit einer Schott 2500 Lichtquelle (Zeiss) mit 485 nm Filter (Zeiss) angeregt und mit einem Lang-Pass Filter (HQ 500, Zeiss) visualisiert (siehe Abbildung 17). Bilder wurden entweder mit einer Digitalkamera (Canon) oder mit einem Stereomikroskop (SV6, Zeiss) mit aufgesetzter CCD-Kamera (HRc, Zeiss) aufgenommen.

7.4. Gewebe- und Proben-Isolierung

Organproben für DNA- und Protein-Isolation wurden auf Trockeneis schockgefroren und bei -20°C gelagert. Organproben für das *in vivo* Imaging wurden nach der Entnahme in PBS bis zur Untersuchung bei 4°C gelagert. Gewebeproben für immunhistochemische Untersuchungen wurden in 4% PFA über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in 20%ige Sukrose-Lösung (in PBS) überführt und über Nacht entwässert. Abschließend wurden die Proben zugeschnitten, in OCT Tissue Tek (Sakura Finetek) eingebettet, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die PCR-Analyse von Schweine-Embryonen wurden diese in 30µl 1x PCR-Puffer mit Proteinase K für 4h verdaut und nach Hitzeinaktivierung (5 Minuten bei 94°C) direkt für die nested-PCR (siehe Kapitel 7.15) eingesetzt.

7.5. Isolierung genomischer DNA

20-50µg Gewebe wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in 500µl Lyse-Puffer (100 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl und 0.1 mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C verdaut. Am nächsten Tag wurden die Proben nach Zugabe von 500µl eines

Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) kräftig geschüttelt und bei 13200 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500µl Chlorophorm erneut geschüttelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13200 rpm wurde die wäßrige Phase abgenommen und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 800µl Isopropanol gefällt. Die genomische DNA wurde über Nacht bei 50°C gelöst und nach Überprüfung der Qualität direkt für PCR oder Southern Blot Analysen eingesetzt.

7.6. Southern Blot Analyse

Der Nachweis einer spezifischen Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch kann mittels Southern Blot Analyse durchgeführt werden (Southern, 1975). Die zu untersuchende DNA wird mit einem Restriktionsenzym behandelt, durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und dort dauerhaft fixiert. Anschließend wird die Membran mit einer radioaktiv markierten Sonden behandelt. Diese Sonde besteht aus einzelsträngiger DNA, welche zur nachzuweisenden Sequenz komplementär ist und diese spezifisch bindet. Die Detektion der radioaktiven Signale (Banden) erfolgt durch Auflegen der Membran auf Phosphorimager-Platten (Southern, 1975).

Zur Untersuchung der Anzahl der integrierten Proviren wurde genomische DNA mit dem Restriktions-Enzym *Bam*HI (New England Biolabs) über Nacht bei 37°C verdaut. *Bam*HI schneidet nur einmal im integrierten Provirus und erzeugt dadurch DNA-Fragmente, deren Größe abhängig von der Integrationsstelle im Genom sind (Abbildung 14). Für die Analyse der proviralen Methylierung wurden andere Restriktionsenzyme (NEB, Roche und Invitrogen) nach der Anleitung des Herstellers verwendet.



Abbildung 14. Schematische Darstellung des integrierten Provirus. LTR, long terminal repeat; ppt, Polypurin-Trakt; PGK, Phosphoglycerat-Kinase Promoter; eGFP, grün fluoreszierendes Protein; W, Woodchuck Hepatitis Virus posttranskriptionell regulatorisches Element; Dreieck, SIN Mutation. Die welligen Doppellinien 5' und 3' vom Provirus symbolisieren das Wirtschromosom. Die für Southern Blot verwendete Sonde ist als horizontale Linie dargestellt.

Die verdaute DNA wurde auf einem 0,7%igen Agarose-Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Southern, 1975). Anschließend wurde das Gel 10 Minuten in 0,2M HCl, 30 Minuten in 0,5M NaOH/1,5M NaCl und weitere 30 Minuten in 0,5M Tris/3,0M NaCl (pH 7,4) gebadet (Southern, 1975). Der Blot wurde sandwichartig aufgebaut (von unten nach oben): Wanne mit Puffer, Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Transfermembran (Gene Screen Plus Transfer Membran; PerkinElmer Life Sciences), Whatman-Papier und Saugpapier. Durch das Auflegen von Saugpapier wurde die DNA über Nacht mit dem Puffer-Fluß vom Gel auf die Membran transferiert. Durch UV-Strahlung wurde abschließend die DNA auf der Membran dauerhaft fixiert.

20x SSC:

175g NaCl

88g Na₃Citrat x 2H₂O

ad 1L H₂O

pH7.0

Für die Hybridisierung wurde eine eGFP-Sonde verwendet. Hierzu wurde die komplette eGFP-Sequenz (748bp) aus dem LV-PGK Vektor mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I heraus geschnitten (Vektor-Map siehe Kapitel 11.1). 100ng eGFP-cDNA wurde in einem Gesamtvolumen von 7µl für 10 Minuten bei 97°C denaturiert und anschließend 10 Minuten auf Eis gekühlt. Radioaktiv gekoppeltes αP³²-dCTP (Amersham Bioscience) und die Komponenten des Random Primed Labelling Kits (Roche) wurden mit der DNA-Sonde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und über eine Nick-Säule (Amersham) aufgereinigt. Nach Vermessung der Radioaktivität mit einem α/β-Counter (Beckman LS 6500) wurde die Sonde 10 Minuten aufgekocht und mit Church-Puffer vermischt. Die Membran wurde mit der in Puffer gelösten Sonde rotierend über Nacht bei 60°C hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit 2xSSC/1%SDS bei 60°C gewaschen. Für die weiteren Wasch-Schritte wurde 0,4xSSC/1%SDS verwendet. Anschließend wurde eine Phosphorimager-Platte (Fujifilm) aufgelegt und nach 72 Stunden entwickelt.

Hybridisierungsansatz:

7µl DNA-Sonde
3µl dXTP-Mix
2µl Hexanukleotide
7µl αP^{32} -dCTP
1µl Klenow Enzym

Church-Puffer:

5g BSA
250ml Phosphatpuffer
175ml SDS (20%)
1ml EDTA (0,5M, pH8)
5ml ssDNA
ad 500ml H₂O

Phosphatpuffer:

193,5ml Na₂HPO₄ (1M)
56,5ml NaH₂PO₄ (1M)

Salmon Sperm DNA (ssDNA):

500mg Salmon Sperm DNA
ad 50ml H₂O

7.7. Protein Isolierung

Gewebeproben wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in Proteasen-inhibierender Lösung (0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2mM CaCl₂ und Protease Inhibitoren, Roche) homogenisiert (ULTRA-TURRAX® T 8). Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13200 rpm und 4°C wurde der wäßrige proteinhaltige Überstand abgenommen. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Der verwendete Coomassie-Farbstoff kann durch anionische Sulfonsäuregruppen kationische Aminosäuren binden. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm. Da die Absorption bei 595nm direkt proportional zur Proteinmenge ist, kann die Konzentration der Probe anhand einer Eichreihe von BSA-Standards ermittelt werden. 5µl Protein-Lösung wurde in 100µl 0,15M NaCl mit 1ml Bradford-Lösung nach exakt 2 Minuten in einem Photometer (Eppendorf) vermessen.

Bradford-Lösung:

50mg Coomassie brilliant blue G250
25ml 98% Ethanol
50ml 85% H₃PO₄
ad 500ml

7.8. Western Blot Analyse

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach dem Protokoll von Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Polymerisation des Gels erfolgt durch Zusatz von APS als Radikalstarter und TEMED als Katalysator. Durch Variation des Vernetzungsgrades des Acrylamids lassen sich die Trenneigenschaften der Gele verändern. Das Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine im Sammelgel fokussiert und im Trenngel aufgetrennt werden. Das im Probenpuffer enthaltene SDS zerstört die nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. Es entsteht ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein, dessen Migrationsverhalten sich in der Elektrophorese proportional zum Molekulargewicht des Proteins verhält.

Protein-Lysate wurden in einem 6x Probenpuffer (6x Lämmli) angesetzt. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 15%iges Trenngel mit einem aufgesetzten Sammelgel verwendet. Die Proben wurden für 4 Minuten zur vollständigen Denaturierung auf 94°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Als Vergleichsmaßstab diente ein vorgefärbter (prestained) Marker (Precision Plus Protein all blue standard, BioRAD).

15% Trenngel:

10ml	Acrylamid für SDS-PAGE
5ml	Trenngelpuffer
5ml	H ₂ O
200µl	SDS (20%)
100µl	APS (20%)
8µl	TEMED

Sammelgel:

0,75ml	Acrylamid für SDS-PAGE
1ml	Sammelgelpuffer
4,1ml	H ₂ O
60µl	SDS (20%)
30µl	APS (20%)
6µl	TEMED

6x Lämmli:

7ml	Tris-Cl/SDS pH 6,8
3ml	Glycerol
1,2ml	Bromphenolblau
1g	SDS
ad 10ml H ₂ O	

10x Elektrophorese-Puffer:

30,2g	Tris-Base
144g	Glycin
10g	SDS
ad 1L H ₂ O	

Trenngelpuffer:

1,5M Tris
0,4% SDS
pH 8,8

Sammelgelpuffer:

0,5M Tris-Base
0,4% SDS
pH 6,8

Die Transfer-Membran (Immobilon-P, Millipore) wurde in Methanol equilibriert und bis zur Benutzung in 1x Blotting-Puffer (1x Elektrophorese-Puffer mit 20% Methanol) gelegt. Der Blot wurde wie ein Sandwich aufgebaut (von unten nach oben: Schwamm, Whatman, Gel, Membran, Whatman, Schwamm) und in einer Blot-Apparatur (Mini Trans Blot, BioRAD) im Kühlraum betrieben (220 mA für eine Stunde). Anschließend wurde die Membran über Nacht getrocknet. Nach dem Blockieren (1h, 5% Milchpulver in TBST) wurde die Membran für eine Stunde mit dem monoklonalen Primärantikörper (anti-eGFP, 1:1000, 1% Milchpulver in TBST mit 0,05% Natrium-Azid; Clontech) inkubiert. Nach 3maligem Waschen in 1% Milchpulver folgte die Inkubation der Membran im Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (1h, anti-Maus, 1:3000 in 1% Milchpulver, Dianova). Abschließend erfolgten Wasch-Schritte in 1% Milchpulver, TBST und H₂O. Zur Detektion der Proteine wurde ECL-Reagenz (Amersham) verwendet. Die an den Zweitantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ zu 3-Aminophthalat. Bei der Reaktion wird ein lichtemittierender, angeregter Übergangszustand durchlaufen. Die Chemolumineszenz wurde mit Hyperfilm ECL (Amersham) visualisiert.

TBST:

100 mM Tris
140 mM NaCl
0,1% Tween 20
pH 8

7.9. Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde peqGOLD TriFast™ (Pqclab) nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die Konzentration und die Reinheit der RNA durch photometrische Messung (Eppendorf) bestimmt. Für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA

wurde das Superscript II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) verwendet. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet.

7.10. Zellkultur

Gewinnung und Kultur von primären Haut-Fibroblasten:

Haut-Fibroblasten vom Schwein oder vom Rind wurden aus Haut-Biopsien gewonnen. Diese wurden nach Entnahme mit Ethanol desinfiziert, mit einer Schere in möglichst kleine Fragmente geschnitten und in 0,05% Trypsin (GIBCO) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde in 10ml DMEM aufgenommen und bei 1100rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert, auf 6-well Platten überführt und über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht adhärierte Geweberückstände durch mehrmaliges Spülen mit PBS entfernt und die Zellen bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Haut-Fibroblasten wurden zur Erhaltung einer kontinuierlichen Wachstumsrate durch Infektion mit PGK-TAg immortalisiert. Immortalisierte Haut-Fibroblasten wurden auf 10cm Zellkulturschalen in DMEM bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert und bei 100% Konfluenz passagiert. (Die Primärkulturen wurden angelegt von Barbara Kessler).

Kultivierung humaner Keratinozyten:

Humane Keratinozyten (zur Verfügung gestellt von Prof. Sabine Werner, Institut für Zellbiologie, ETH-Hönggerberg, Zürich) wurden in Keratinozyten-Wachstumsmedium (Gibco), supplementiert mit Rinder-Hypophysenextrakt (Gibco) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin), bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Analyse epigenetischer Mechanismen durch Inkubation mit 5-AzaC und TSA:

Haut-Fibroblasten der transgenen Schweine #8779 und #8777 wurden auf eine 6-well Platte ausgestreut (30% konfluent). Am nächsten Tag wurden sie mit 8µM 5-Azacytidin (5-AzaC), 100nM Trichostatin A (TSA, in DMSO gelöst) oder DMSO (Kontrolle) inkubiert (Tabelle 1, siehe auch Abbildung 66). Da 5-AzaC während des Inkubationszeitraums nicht stabil war (Notari and DeYoung, 1975), wurde das Medium und die Reagenzien alle 24 Stunden gewechselt. Nach 2 Tagen Inkubation mit 5-AzaC oder TSA wurden die Fibroblasten für 3 weitere Tage mit oder ohne

TSA (Ø) inkubiert (Tabelle 1). Nach insgesamt 5 Tagen wurden die Fibroblasten entweder für die FACS-Analyse fixiert oder zur DNA-Extraktion pelletiert.

Tabelle 1. Inkubations-Schema

Bezeichnung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Aza	5-AzaC	5-AzaC	Ø	Ø	Ø
TSA	TSA	TSA	Ø	Ø	Ø
Aza/TSA	5-AzaC	5-AzaC	TSA	TSA	TSA

Lentivirale Infektion von Zellen:

Zellen wurden auf 6-well oder 24-well Platten ausgesät und infiziert. 1-10µl Virus wurde in frischem DMEM (300µl für eine 24-well Platte oder 800µl für eine 6-well Platte) gelöst und nach Absaugen des Mediums direkt auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert und am nächsten Morgen das Medium auf 1ml (24-well) bzw. 3ml (6-well) aufgefüllt.

7.11. Immunhistochemie

Die in OCT eingebetteten Gewebelöcke wurden in einem Kryotom (HM.500, Microm) geschnitten (10µm). Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Roth) aufgebracht, kurz bei RT getrocknet und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

eGFP-Detektion durch ABC-Signalverstärkung:

Das immunhistochemische Verfahren zur Visualisierung der eGFP-Antigene basiert auf der Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC) Methode. Zu Beginn wurde das Einbettmedium auf den Cryo-Schnitten in einem TBS-Bad (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) entfernt. Zur Zerstörung endogener Peroxidasen wurden die Objektträger für 30 Minuten in einer Methanol-Lösung (mit 3,3% H₂O₂) gebadet. Anschließend wurde Blockierlösung [30 Minuten, 1% BSA mit 2% Hühner-Serum (Vector Laboratories) in TBS] direkt auf die Objektträger pipettiert. Der Primärantikörper (anti-eGFP, monoklonal, 1:200 in Blockierlösung; Clontech) wurde über Nacht auf die Objektträger gegeben. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in 1% BSA gewaschen und für

eine Stunde mit dem Biotin-gekoppelten Sekundär-Antikörper (anti-Maus, 1:200 in 1% BSA; Dianova) inkubiert. Nach Waschen in TBS wurde das ABC-Reagenz (Vector Laboratories) nach der Anleitung des Herstellers für 30 Minuten appliziert. Nach erneutem Waschen wurden die Objektträger für 10 Minuten in Diaminobenzidin-Lösung (DAB) inkubiert. DAB wurde durch die im ABC-Reagenz enthaltene Peroxidase zu einem braunen Farbstoff umgesetzt. Die Objektträger wurden in H₂O gewaschen, in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (75%, 95% und 100%) entwässert und mit Roti[®]-Histokitt (Roth) eingedeckelt.

DAB-Lösung:

270 µg/ml DAB
0,5 M Tris
0,02% H₂O₂

eGFP-Detektion durch direkte Fluoreszenz:

Cryo-Schnitte wurden zur Kernfärbung für 10 Minuten in 4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 1 µg/ml) inkubiert und anschließend mit PermaFluor (Immunotech) eingedeckelt.

Insulin-Detektion:

An histologischen Schnitten des Pankreas wurde eine zweite Färbung durchgeführt, um Insulin und eGFP auf dem gleichen Objektträger zu visualisieren. Dazu wurden DAB-gefärbte Objektträger (eGFP-Färbung) mit einem polyklonalen anti-Insulin Antikörper (1:1000, BioTrend) für eine Stunde inkubiert. Nach Waschen in TBS wurde ein alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter Sekundär-Antikörper (anti-Meerschwein, 1:200; Dianova) für eine Stunde appliziert. Anschließend wurden die Schnitte in das AP-Reagenz gestellt. In einem Zeitraum von 10 Minuten wurden BCIP und NBT von der alkalischen Phosphatase des Sekundär-Antikörpers zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

AP-Reagenz:

1.21 g/l Tris	100 mg/l 8-Bromo-4-chloro-3-indoyl Phosphat (BCIP)
5.84 g/l NaCl	200 mg/l Nitrotetrazolium Blau (NBT)
1.01 g/l MgCl ₂	pH 9.5

DBA-Färbung:

Zur Färbung der Spermatogonien wurden die Objektträger für 1 Stunde bei RT mit dem TRITC-gekoppelten *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA, final 100 µg/ml) inkubiert und anschließend mit PermaFluor (Immunotech) eingedeckelt.

7.12. Mikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop (Zeiss) mit den in Tabelle 2 aufgeführten Filtern und digitaler Kamera (HMRc, Zeiss) durchgeführt. Zur Fluoreszenz-Anregung wurde eine Atto Arc Lichtquelle mit HBO-Lampe (100W, Zeiss) verwendet. Mit einem an das Mikroskop angeschlossenen PC und der AxioVision-Software (Versionen 3.1, Zeiss) erfolgte die Mikroskopsteuerung und Bildaufnahme.

Tabelle 2. Verwendete Filter am Axioskop 2 Mikroskop.

Bezeichnung	#	Anregung	Strahlteiler	Emission	Fluorochrome
Filterset 01	(488001-0000)	BP 365/12	FT 395	LP 397	DAPI
Filterset 10	(488010-0000)	BP 450-490	FT 510	LP 515-565	eGFP
Filterset 38	(1031-350)	BP 470/40	FT 495	BP 525/50	eGFP
Filterset 15	(488015-0000)	BP 546/12	FT 580	LP 590	TRITC
Filterset 31	(1031-350)	BP 565/30	FT 585	LP 620/60	TRITC

Konfokalmikroskopie:

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem LSM 510 Meta Laser-Konfokalmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Zur Visualisierung der eGFP Fluoreszenz wurde ein Argon Laser (488nm) verwendet

7.13. Bisulfit Sequenzierung

Die Bisulfit-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der 5-Methylcytosine. Durch die Behandlung von DNA mit Natriumbisulfit werden alle Cytosin-Basen in Uracil umgewandelt. Cytosine, die einen 5-Methylrest tragen, werden jedoch nicht desaminiert (Frommer *et al.*, 1992) (Abbildung 64). Die zu untersuchende Sequenz kann nun mit Strang-spezifischen Primern

amplifiziert werden (Frommer *et al.*, 1992). Nach der Subklonierung der Amplikons kann durch Sequenzierung die Anzahl und Position der methylierten CpG-Basen bestimmt werden (Abbildung 64 und Kapitel 11.2).

DNA Verdau und Vorbereitung:

Genomische DNA wurde mit *EcoRI* über Nacht verdaut, um möglichst kleine DNA-Fragmente zu erzeugen (Rein *et al.*, 1997). Zur Aufreinigung der DNA wurde diese mit Phenol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde Vakuum-getrocknet und anschließend in TE-Puffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert. Die gelöste DNA wurde zur vollständigen Denaturierung 2 mal bei -80°C schockgefroren, bei RT wieder aufgetaut und anschließend für 10 Minuten auf 100°C erhitzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA in einem Photometer (Eppendorf) vermessen.

Bisulfit-Konvertierung der DNA:

2µg DNA wurden in einem 20µl Volumen durch Zugabe von NaOH-Lösung (0,3M final) bei 37°C für 15 Minuten denaturiert. 120µl BS-Lösung wurde zur denaturierten DNA zugegeben und in einem Thermocycler (Biometra) nach folgenden Programm inkubiert: 15x (30 s bei 95°C und 15 Minuten bei 50°C). Anschließend wurde die DNA über ein Reinigungs-System (Wizard Purification System, Promega) nach der Anleitung des Herstellers vom Salz befreit und in 103,6µl TE-Puffer eluiert. 6,4µl NaOH (5M) wurde zugegeben und die Lösung für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 47µl NH₄OAc (10M, pH 7.0) neutralisiert, mit 500µl 96%igem Ethanol präzipitiert, Vakuum-getrocknet und in 50µl TE-Puffer resuspendiert (Clark *et al.*, 1994). Aliquots wurden bis zur Benutzung bei -20°C gelagert.

BS-Lösung: _____

3.6 M Natriumbisulfit

0.6 mM Hydrochinon

pH 5.0

PCR-Amplifikation:

Zur Amplifikation (234bp-Sequenz innerhalb des PGK-Promoters und 255bp-Sequenz im eGFP-Gen) mittels PCR (siehe Kapitel 7.15) wurden 3-10µl konvertierte DNA eingesetzt. Der Reaktions-Mix wurde in einem Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm inkubiert: 45x (30 s bei 95°C, 1 Minute bei 40°C und 1 Minute bei 72°C).

PCR-Ansatz:

3-10 µl Bisulfit-konvertierte DNA
5 µl 10x Reaktionspuffer
2,5µl Forward-Primer (10pM/µl)
2,5µl Reverse-Primer (10pM/µl)
8µl dNTPs (je 1,25mM)
0,5µl Taq-Polymerase (5U/µl)
x µl H₂O (ad 50µl)

Primer:

PGK_for ATGGGTTGTGGTTAATAG
PGK_rev CCCTTACTAACCATAATAA
GFP_for GGGTATAAGTTGGAGTATAA
GFP_rev CTCCAACAAAACCATATAAT

Subklonierung der PCR-Fragmente und Sequenzierung:

Die PCR-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und über ein Gel Extraktions-Kit (GFX Purification Kit) eluiert. Anschließend wurden die Fragmente nach der Anleitung des Herstellers in den pCA2.1 Vektor (Topo TA cloning kit, Invitrogen) kloniert und in chemisch kompetente XL-1 *E.coli* Bakterien transformiert. Aus den gewachsenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

7.14. Auftrennung, Isolierung und Modifikation von DNA

Nukleinsäuren sind negativ geladen und können deshalb auf einem Gel ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid in den DNA-Doppelstrang können die aufgetrennten DNA-Fragmente mit UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurde ein DNA-Marker (1kb Ladder, Invitrogen) verwendet. Um den Verlauf der Elektrophorese beobachten zu können, wurden dem Probenpuffer Farbmarker zugegeben.

10x Probenpuffer:

7M	Harnstoff	10mM	Tris (pH7)
40%	Glycerin	0,01%	Bromphenolblau
50mM	EDTA	0,01%	Orange G

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,5-12 kb wurde eine horizontale Elektrophorese in Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurde Agarose in 1x TBE in der Mikrowelle geschmolzen. Je nach Anwendung wurden 0,7-2%ige Gele verwendet. Vor dem Gießen in die Gelkammer (Pqclab) wurde der flüssigen Agarose Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 800ng/ml zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung mit 1x TBE als Laufpuffer. Das GFX™-System (Amersham) eignet sich zur Isolation von DNA aus Agarosegelen, flüssigen Proben oder PCR-Reaktionen. Die Aufreinigung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Zur Fällung von wässriger DNA wurde die 1,5fache Menge Isopropanol zugegeben und geschüttelt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA getrocknet und in der gewünschten Menge Wasser aufgenommen.

Restriktionsenzyme sind ein wichtiges Werkzeug für molekularbiologische Arbeiten. Sie erkennen und spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Basensequenzen. Die Restriktionsenzyme (NEB, Roche, Invitrogen) wurden nach der Anweisung des Herstellers verwendet. Die T4 DNA-Ligase (NEB) katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch. Sie wurde zur Umklonierung des LV-PGK Vektors in den LV-K14 Vektor verwendet. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend in chemisch kompetenten XL-1 E.coli Bakterien transformiert.

Ligationsansatz:

20ng	LV-PGK (ohne PGK-Promoter)
150ng	K14-Promoter
1,5µl	10x Ligase-Puffer
1µl	Ligase
x µl	H ₂ O (ad 15µl)

10x TBE:

0,9M	Tris
0,9M	Borsäure
20mM	EDTA (pH 8)

7.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur selektiven Vermehrung von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Nukleinsäure-Gemisch. Der DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Hitzedenaturierung aufgeschmolzen. Dann können zwei Oligonukleotid-Primer an den Enden der zu amplifizierenden Sequenz binden (Annealing). Ausgehend von diesen kurzen doppelsträngigen Bereichen wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5' → 3' Richtung synthetisiert (Elongation). Bei Wiederholung dieser Reaktionsfolge kommt es nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der DNA und damit zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der DNA-Sequenz, die von den Oligonukleotiden flankiert wurde.

Standard-Protokoll:

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Zur Amplifizierung von DNA wurde eine thermostabile DNA-Polymerase (QBioGene), die *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, nach dem in Tabelle 3 aufgeführten Temperaturprogramm verwendet. Die Polymerisationszeit (y) richtet sich nach der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Stückes. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert ca. 1000bp/min. Die Temperaturen für das Primer-Annealing (x) wurden an die jeweiligen Primer-Schmelztemperaturen (berechnet nach Oligo Calculator: <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>) angepaßt. Für den Nachweis von eGFP wurde entweder das Primer-Paar *GFP1_for* und *GFP1_rev* (Amplikon von 300 Basen) oder das Paar *GFP3_for* und *GFP3_rev* (218bp Amplikon) verwendet.

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>eGFP-Primer</u>	
x µl	Template	<i>GFP1_for</i>	TGACCTACGGCGTGCAGTGC
5µl	10x Puffer (mit MgCl ₂)	<i>GFP1_rev</i>	TCACCTTGATGCCGTTCTTCT
2,5µl	Forward-Primer (10pm/µl)	<i>GFP1n_for</i>	CTGAAGTTCATCTGCACCA
2,5µl	Reverse-Primer (10pm/µl)	<i>GFP1n_rev</i>	GTCGGCGAGCTGCACGCTGC
0,5µl	Taq-Polymerase (5U/µl)	<i>GFP2_for</i>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
8µl	dNTPs (je 1,25mM)	<i>GFP3_for</i>	AAGATCCGCCACAACATCG
ad 50µl H ₂ O		<i>GFP3_rev</i>	TTGTACAGCTCGTCCATGC

Tabelle 3. Verwendetes Temperaturprogramm.

	Initiale Denaturierung	Zyklus	Verlängerung (Extension)
<i>Denaturierung</i>	94°C, 2min	94°C, 40s	
<i>Primer-Anlagerung</i>		x °C, 30s	
<i>Polymerisation</i>		72°C, y min	72°C, 2min

Nested-PCR zur Amplifizierung von embryonaler DNA:

Im ersten Zyklus wurde zu 30µl Embryo-Lysat der an das Volumen angepaßte Reaktionsmix mit den Primern *GFP2_for* und *GFP3_rev* zugegeben (30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C) (siehe Abbildung 33). Anschließend wurde 10µl der ersten PCR-Reaktion abgenommen und für den zweiten Zyklus verwendet. Hierzu wurden 35 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C mit den Primern *GFP1n_for* und *GFP1n_rev* gefahren (siehe Abbildung 33).

Reverse Transkriptase PCR-Reaktion (RT-PCR):

Um die Expression von eGFP in Proben der Tiere #8774, #8784, #8786, #8788 und #8791 zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt (siehe Abbildung 55). Die RNA-Isolation und die Synthese von cDNA wurde unter Kapitel 7.9 beschrieben. In jede PCR-Reaktion wurde als Template 2µl der entsprechenden cDNA eingesetzt. Es wurden die Primer *GFP1n_for* und *GFP1n_rev* verwendet und folgendes Temperatur-Programm gefahren: 30s bei 95°C, 35s bei 55°C und 30s bei 72°C für insgesamt 40 Zyklen.

Nachweis der proviralen Integrität:

Es wurde 3µl genomische DNA als Template eingesetzt und die PCR-Reaktionen mit den in Tabelle 4 aufgeführten Temperaturen für 35 Zyklen gefahren.

Tabelle 4. Verwendete Primer zum Nachweis des LV-PGK Provirus in genomischer DNA.

Fragment	Primer	Sequenz	Temp [° C]	Länge [kb]
5'LTR-gag	<i>Forward</i>	GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG	57	0.7
	<i>Reverse</i>	AATTCATTCTCCAATTGTCC		
RRE-SA	<i>Forward</i>	GAGCAGCAGGAAGCACTATG	53	0.8
	<i>Reverse</i>	TGTTGCTATTATGTCTACTAT		
ppt-PGK	<i>Forward</i>	AGAATAGTAGACATAATAGC	49	0.6
	<i>Reverse</i>	GTCGGTGATTTCGGTCAACGA		
eGFP	<i>Forward</i>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	57	0.7
	<i>Reverse</i>	TTGTACAGCTCGTCCATGC		
W-3'LTR	<i>Forward</i>	ACGAGAAGCGCGATCACATGGTC	58	1.0
	<i>Reverse</i>	CTGCTAGAGATTTCCACACTGAC		

7.16. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte nach einer modifizierten Didesoxymethode mit einem ABI Prism™ 310 Sequenzer (Applied Biosystems). In einer Amplifizierungsreaktion wurden zusätzlich zu den herkömmlichen Desoxynukleotiden (dNTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP) eingesetzt (ABI Prism Big Dye Kit, Applied Biosystems). Nach Einbau eines ddNTP-Bausteins kann der DNA-Doppelstrang nicht mehr verlängert werden und es kommt zum Kettenabbruch. Durch sorgfältige Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Jedes der vier Didesoxynukleotide ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Detektion erfolgt nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung.

Bei einer Sequenzierungs-Reaktion mit einer kurzen Kapillare können bis zu 500 Basen identifiziert werden. Für eine Sequenzierung wurden 700ng Plasmid-DNA, 1µl Primer (10 pM/µl), 1µl DMSO und 2,5µl Ready Reaction Mix eingesetzt (12µl Gesamtvolumen). Anschließend wurde der Mix in einem Thermocycler (Biometra) bei folgendem Temperatur-Programm amplifiziert: 95°C für 2 Minuten, 25 x (95°C für 30 Sekunden, 50°C für 40 Sekunden und 60°C für 4 Minuten). Die Reaktionsprodukte der PCR wurden präzipitiert und in 30µl H₂O resuspendiert.

8. Ergebnisse

8.1. Erzeugung transgener Schweine

Die geringe Effizienz der DNA-MI erlaubte bisher keine breite Anwendung dieses Verfahrens zur Produktion transgener Schweine. Transgene Schweine wären jedoch in vielerlei Hinsicht von großem Interesse für die medizinische und pharmazeutische Forschung (Abbildung 15, siehe auch Kapitel 5.4.5).

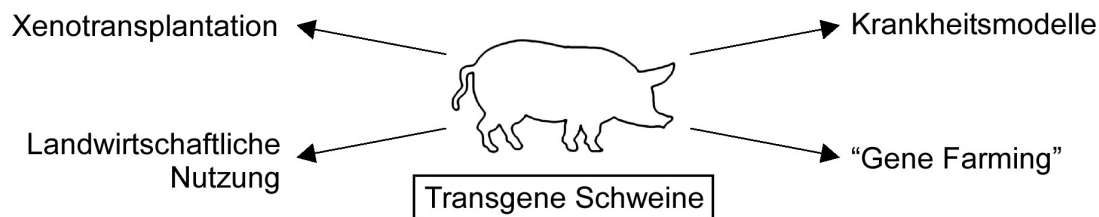


Abbildung 15. Potentielle Einsatzgebiete für transgene Schweine.

Aufgrund der anatomischen und physiologischen Unterschiede zwischen Menschen und Nagetieren können viele humane Krankheiten im Maus-Modell nicht adäquat untersucht werden. Zum Beispiel zeigen diabetische Mäuse große Toleranz gegenüber erhöhten Blutzuckerspiegeln und entwickeln keine der für Menschen typische Folgeerkrankungen (z.B. diabetische Retinopathie) (Jhala *et al.*, 2003). Deshalb wären Schweine wesentlich besser zur Entwicklung von Modellen des Diabetes Mellitus und anderer menschlicher Erkrankungen geeignet (Abbildung 15) (Kues and Niemann, 2004). Weitere potentielle Anwendungsgebiete sind die Xenotransplantation, "Gene Farming" und die landwirtschaftliche Nutzung (Abbildung 15).

8.1.1. Subzonale Virusinjektion und Embryo-Transfer

Für die Infektion von ein- bis zweizelligen Schweine-Embryonen wurde die subzonale Injektion gewählt. Dabei wurde konzentrierte Virus-Lösung in den perivitellinen Raum, der zwischen der Zona Pelluzida und der Zell-Membran liegt, injiziert (Abbildung 16).

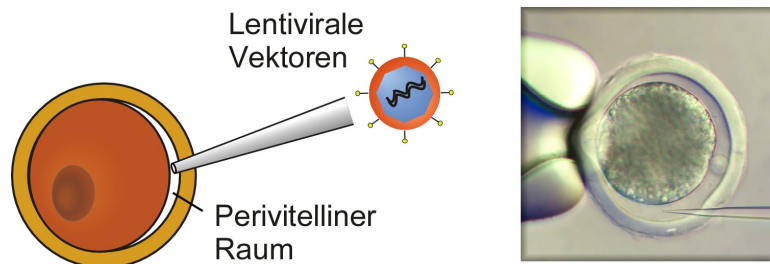


Abbildung 16. Subzonale Virus-Injektion in den perivitellinen Raum. Schematische Darstellung einer Zygote (umgeben von der Zona Pelluzida), der Injektionskapillare und des Pronukleus (links). Entsprechendes Foto einer Schweine-Zygote (rechts).

Das verwendete SIN-Vektorkonstrukt enthielt eine Expressionskassette bestehend aus dem PGK-Promoter (Michelson *et al.*, 1983; Singer-Sam *et al.*, 1983; Yang *et al.*, 1988) und dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP) als Reportergen. Wegen seiner einfachen Nachweisbarkeit, ist eGFP - das grün fluoreszierende Protein aus der Tiefseequalle *Aequorea Victoria* - ein weit verbreiteter Marker in Studien über Gen-Expression und Protein-Lokalisation (Chalfie, 1995; Chalfie *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1995). Da eGFP weder einen Kofaktor noch ein Substrat benötigt, kann es in verschiedenen Spezies und in lebenden Systemen eingesetzt werden (Heim *et al.*, 1994). Die Fluoreszenz des klassischen GFPs ist abhängig von der Schlüsselsequenz Ser-Tyr-Gly (Aminosäuren 65-67). Diese Sequenz unterliegt einer spontanen Oxidation, wodurch ein nicht-fluoreszierendes, zyklisches Chromophor (Inouye and Tsuji, 1994) gebildet wird. EGFP enthält dagegen Ser-65-Thr und Phe-64-Leu Mutationen, welche die Stabilität der Fluoreszenz erhöhen (Cormack *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Der PGK-Promoter wurde gewählt, da er bereits in chimären Mäusen untersucht wurde und eine ubiquitäre Verteilung der eGFP-Expression gezeigt hatte (Zernicka-Goetz *et al.*, 1997). Zusätzlich enthielt der Vektor cPPT zur Steigerung der nuklearen Translokation und WPRE zur Erhöhung der Transgen-Expression (Follenzi *et al.*, 2000; Zufferey *et al.*, 1999) (siehe auch Kapitel 5.3). Die verwendeten rekombinanten Lentiviren (siehe Abbildung 13) wurden mit *VSV.G* pseudotypisiert (Naldini *et al.*, 1996) und waren daher in der Lage auch Schweine-Zellen bzw. -Embryonen zu infizieren.

Nach der subzonalen Injektion von LV-PGK wurden zwischen 27 und 58 Embryonen pro Empfänger endoskopisch transferiert. Aus 6 Trächtigkeiten wurden insgesamt 46 Tiere geboren (siehe Tabelle 5).

8.1.2. *In vivo* Analyse der eGFP-Expression

Die Expression des Transgens wurde zunächst am lebenden Tier mittels *in vivo* Fluoreszenz-Imaging durchgeführt (Pfeifer *et al.*, 2001). Im abgedunkelten Stall wurde die eGFP-Fluoreszenz der Tiere durch blaues Licht angeregt und mit einem Gelbfilter visualisiert (Abbildung 17).

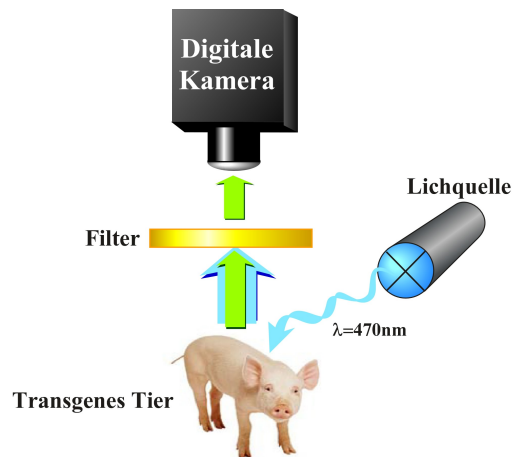


Abbildung 17. Schematische Darstellung des *in vivo* Fluoreszenz-Imagings. Grafik modifiziert nach (Pfeifer *et al.*, 2001).

26 der 46 geborenen Schweine zeigten eine mittels *in vivo* Imaging sichtbare Fluoreszenz (Abbildung 18A). Neben der Haut und den Klauen (Abbildung 18A) waren auch die Pupillen (Abbildung 18B und C), die Zunge und das Zahnfleisch eGFP-positiv (Abbildung 18E und F). Nicht transgene Schweine aus dem gleichen Wurf zeigten dagegen keine Fluoreszenz (Abbildung 18D und G).

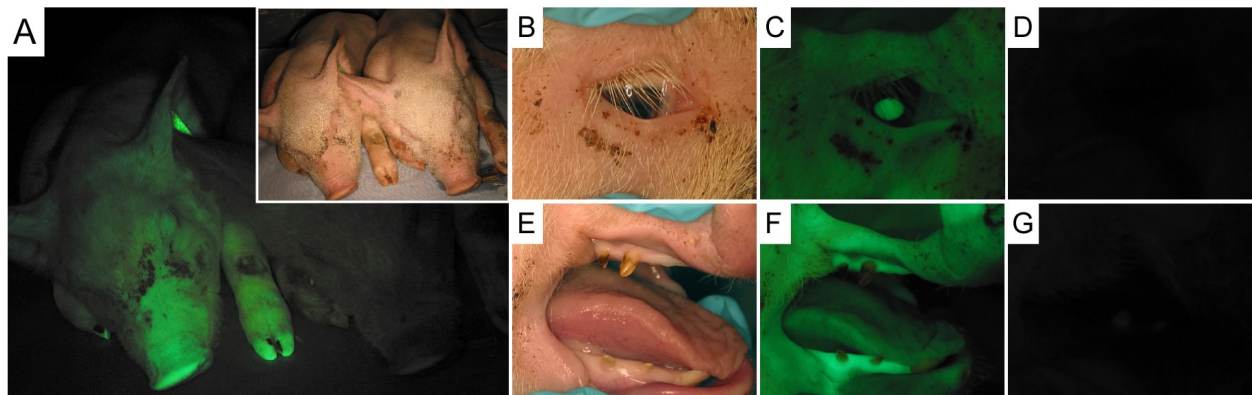


Abbildung 18. Expressionsanalyse mittels *in vivo* Fluoreszenz-Imaging am lebenden Tier. (A) Das transgene Tier (links) zeigt eGFP-Expression in der Haut und den Klauen, während das gleichaltrige Wildtyp-Tier (rechts) nicht fluoresziert. Die Einblendung zeigt die entsprechende Hellfeld-Aufnahme. Auch Augen (B, C), Zunge und Zahnfleisch (E, F) des transgenen Schweins fluoreszierten grün. (D, G) Wildtyp-Tier.

8.1.3. Analyse der geborenen Tiere

Um die Anzahl der integrierten Proviren zu untersuchen wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA aus Hautproben isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. *Bam*HI schneidet nur einmal innerhalb des integrierten Provirus und erzeugt daher, abhängig von der Integrationsstelle im Wirtsgenom, DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe (Abbildung 19, siehe auch Abbildung 14). Die Anzahl der Banden im Southern Blot repräsentiert somit die Anzahl der integrierten Proviren. Die Analyse der 25 Tiere aus den ersten 4 Trächtigkeiten ist in Abbildung 19 beispielhaft dargestellt.

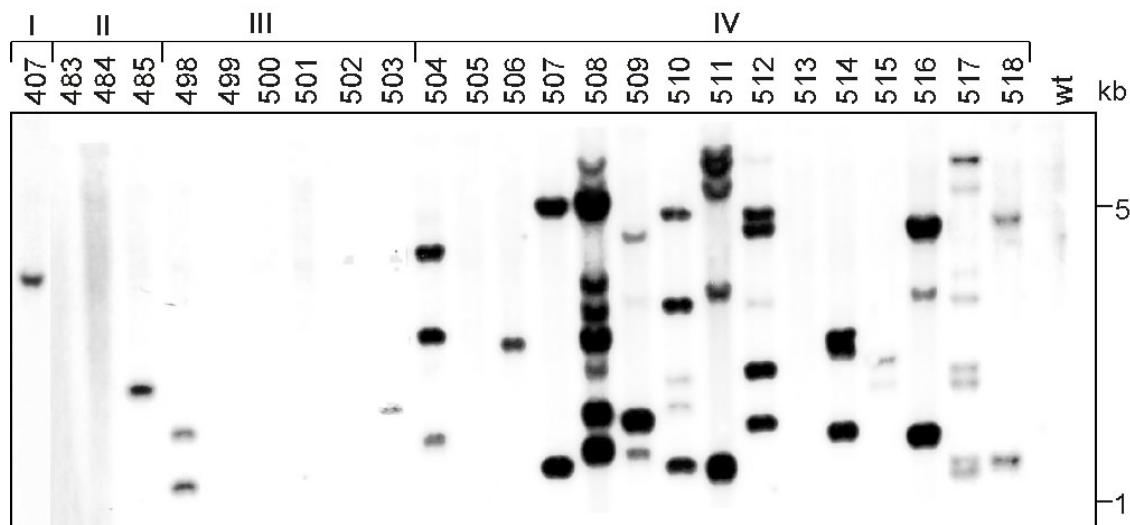


Abbildung 19. Southern Blot Analyse der 25 Schweine aus den ersten 4 Trächtigkeiten (#407 - #518) und eines gleichaltrigen Wildtyp-Schweins (wt).

32 (70%) der insgesamt 46 - nach subzonaler LV-PGK Injektion - geborenen Tiere (Founder) trugen mindestens eine Kopie des Provirus im Genom (Tabelle 5). Die Anzahl der integrierten Viren variierte in den Tieren zwischen 1 und 20 mit einer durchschnittlichen Integrantenzahl von $4,6 \pm 0,9$.

Tabelle 5. Transgenese-Rate und eGFP-Expression

Trächtigkeit	I	II	III	IV	V	VI	Σ
LV-PGK Embryonen	58	27	46	43	32	38	244
geborene Tiere	1	3	6	15	10	11	46
transgene Tiere	1	1	2	13	5	10	32
eGFP⁺ Tiere	1	0	2	13	4	10	30

8.1.4. Untersuchung des Mosaicismus

Die virale Infektion der Zellen eines Embryos kann unterschiedlich effizient sein. Daher ist es möglich, daß ein aus Virus-Infektion entstammendes Tier unterschiedlich viele Integranten in seinen Organen trägt. Diesen genotypischen Unterschied innerhalb eines Organismus nennt man Mosaicismus. Der Grad des Mosaicismus ist abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos zum Zeitpunkt der Infektion (Abbildung 8). Lentivirale Infektion von murinen Morulae (siehe Abbildung 8) führte zur Geburt von Mäusen die einen ausgeprägten Mosaicismus zeigten (Pfeifer *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu sollte bei der Infektion einer einzelligen Zygote (Abbildung 8) die Verteilung des Provirus im kompletten Organismus identisch sein (sofern die Infektion vor der ersten Zellteilung stattgefunden hat).

Um den Mosaicismus zu untersuchen, wurden Derivate der 3 Keimblätter eines transgenen Schweins (#407, siehe Abbildung 19) mittels Southern Blot und PCR untersucht. Zu den Geweben endodermalen Ursprungs zählen Darm, Lunge, Magen, Leber und Pankreas. Muskel, Niere, Herz, Milz und Blut gehören zu den mesodermalen Geweben. Ektodermale Gewebe sind Haut, Gehirn und Auge. Extraembryonale Gewebe (Plazenta und Nabelschnur) entstehen aus dem Trophoblasten, also der äußeren Zellschicht der Blastozyste (siehe Abbildung 9), während der Fetus sich aus der inneren Zellmasse entwickelt. Zunächst wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. In allen untersuchten Geweben und im Blut konnte die provirale DNA nachgewiesen werden (Abbildung 20A). Auch die Proben von Plazenta und Nabelschnur zeigten Virus-spezifische Banden in der PCR (Abbildung 20A und B).

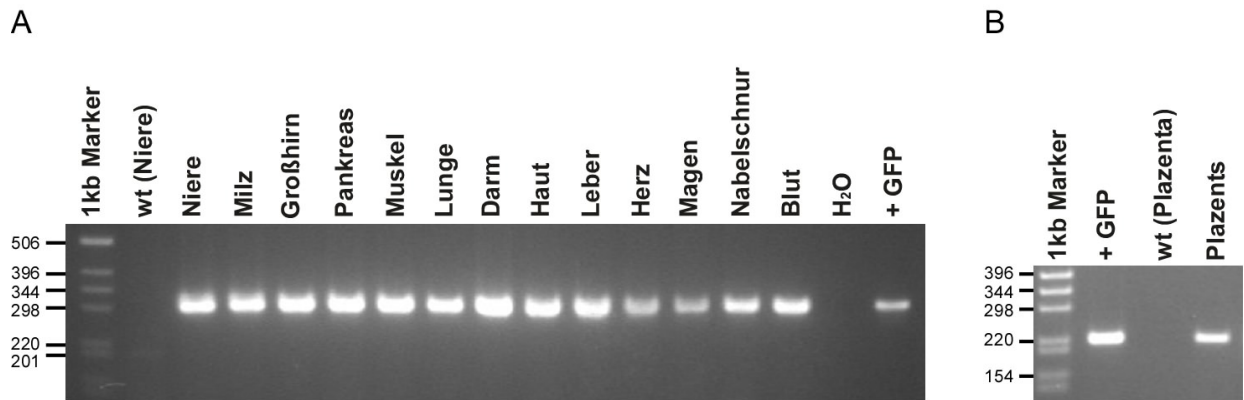


Abbildung 20. PCR-Analyse der Organe des transgenen Schweins #407 (A) und der Plazenta (B) auf Anwesenheit der proviralen DNA. +GFP, Positivkontrolle.

Die Integrationsorte der Proviren in verschiedenen Organen wurde mit Southern Blot untersucht (Abbildung 21). Wie bei der Southern Blot Analyse der Haut-DNA (siehe Abbildung 19) wurde auch hier ein *Bam*HI-Verdau verwendet (Abbildung 21A). In den untersuchten Organen zeigte sich das gleiche Integrationsmuster: Die Anzahl der Integranten und die Position des Provirus innerhalb des Genoms war in den untersuchten Organen identisch (Abbildung 21B).

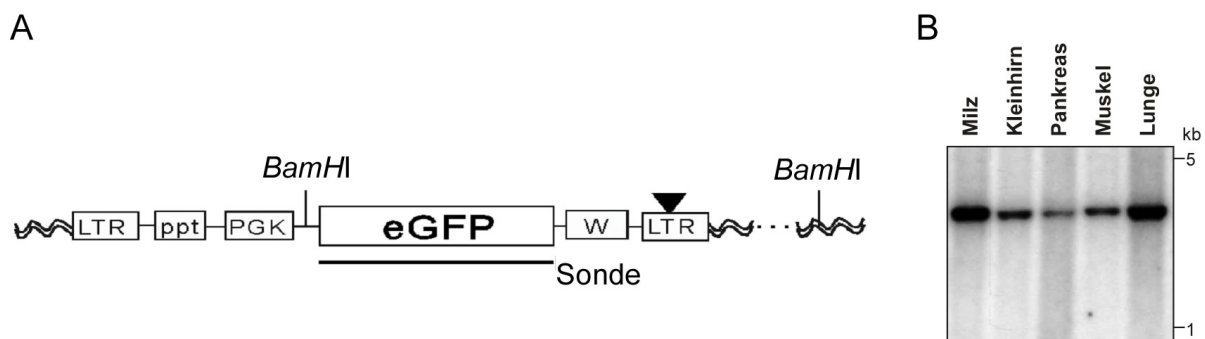


Abbildung 21. Schematische Darstellung des integrierten Provirus (A). Southern Blot von Organ-Proben (B).

Die Untersuchung von Tier #407 ergab demnach keinen Hinweis auf einen stark ausgeprägten Mosaicismus. Organe der verschiedenen Keimblätter und die extraembryonalen Gewebe trugen LV-PGK. Des weiteren war auch der Integrationsort in den untersuchten Geweben identisch.

8.1.5. Expressionsanalyse verschiedener Organe

Die Analyse der Transgen-Expression wurde zunächst makroskopisch mittels Fluoreszenz-Stereomikroskopie durchgeführt. Alle untersuchten Organe von Tier #511 (siehe Abbildung 19) waren eGFP-positiv. Beispielhaft sind Derivate der 3 verschiedenen Keimblätter dargestellt: Haut (Abbildung 22A und B), Kleinhirn (Abbildung 22C und D), Niere (Abbildung 22E und F) und Pankreas (Abbildung 22G und H) zeigten grüne Fluoreszenz, während entsprechende Wildtyp-Kontrollen nicht fluoreszierten (Abbildung 22).

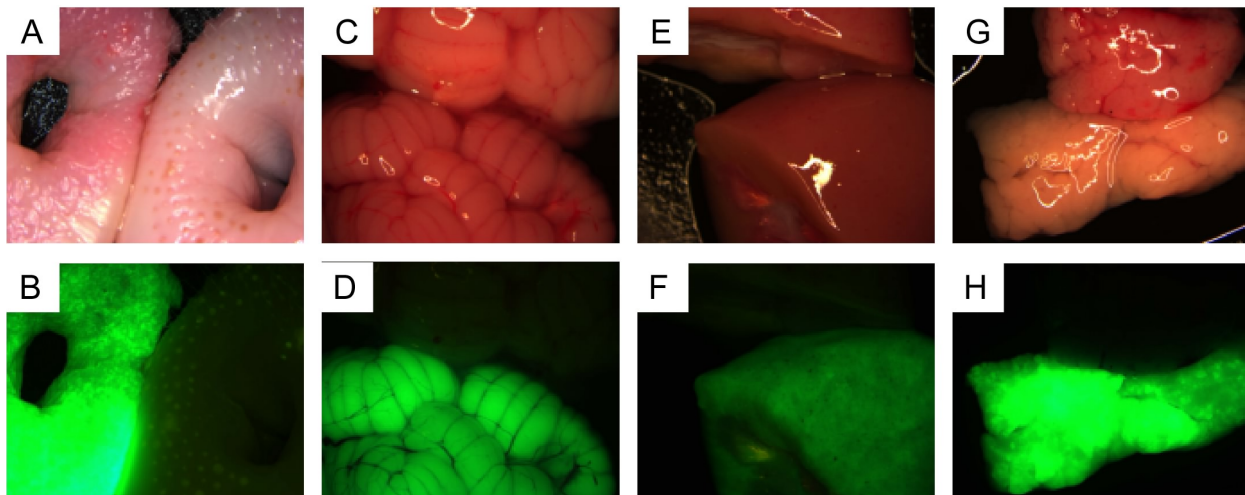


Abbildung 22. Analyse der eGFP Expression von Haut (A und B, links), Kleinhirn (C und D, unten), Niere (E und F, unten) und Pankreas (G und H, unten) des transgenen Tieres #511 mittels Fluoreszenz-Imaging. Die entsprechenden Organe eines gleichaltrigen Kontroll-Tieres (B rechts; D, F und H, oben) waren eGFP-negativ. Gezeigt sind Hellfeld- (A, C, E und G) und Fluoreszenz-Aufnahmen (B, D, F und H).

Zur Untersuchung der Transgen-Expression auf zellulärer Ebene wurden immunhistochemische Versuche mit anti-eGFP Antikörpern oder direkter Epifluoreszenz durchgeführt. Abbildung 23 zeigt die immunhistochemische Untersuchung der eGFP-Expression in der Haut. Die Haut besteht aus Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) (Abbildung 23A). Epidermis und Dermis werden als Haut (Kutis) im engeren Sinne bezeichnet (Welsch, 2001). Die Epidermis wird von einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel gebildet, welches vorwiegend aus Keratinozyten besteht (Abbildung 23A). In der basalen Epithelschicht befinden sich außer Keratinozyten auch teilungsfähige Stammzellen (Welsch, 2001). In allen Schichten der Epidermis und Dermis konnte die Expression des Transgens nachgewiesen werden (Abbildung 23B).

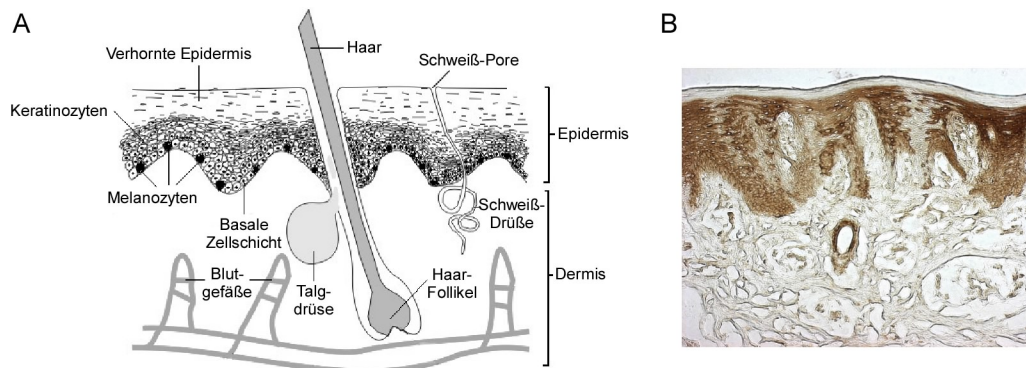


Abbildung 23. Histologische Analyse der Transgen-Expression der Haut. (A) Schematische Übersicht der Haut zur Orientierung. Abbildungen modifiziert nach <http://www.patient.co.uk/showdoc/Plsinl/177.gif>. (B) Immunhistochemische Färbung (braun) zeigt eGFP-Expression in der Epidermis und der Dermis.

Im Kleinhirn (Abbildung 24A) war die eGFP-Expression am stärksten in der Körnerzellschicht. Des weiteren konnte eGFP auch in Purkinje-Zellen (Pfeilköpfe) und der molekularen Schicht nachgewiesen werden (Abbildung 24A).

In den untersuchten Nieren-Schnitten zeigten die Glomeruli (Pfeilköpfe), distale Tubuli (schwarze Pfeile) und proximale Tubuli (weiße Pfeile) grüne Fluoreszenz bzw. braune Antikörperfärbung, wobei diese in den proximalen Tubuli am stärksten war (Abbildung 24B).

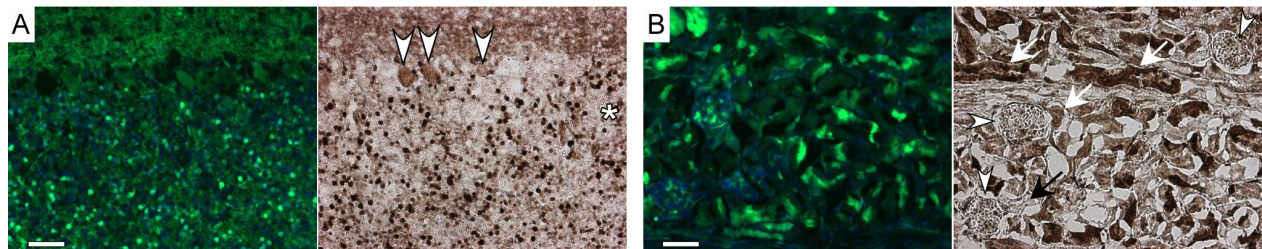


Abbildung 24. Histologische Analyse der Transgen-Expression. (A) EGFP Expression im Kleinhirn. Purkinje-Zellen sind durch Pfeilköpfe und die Körnerzell-Schicht mit * gekennzeichnet. (B) EGFP Expression der Niere. Pfeilkopf, Glomerulus; weißer Pfeil, proximaler Tubulus; schwarzer Pfeil, distaler Tubulus. Gezeigt sind konsekutive Schnitte der transgenen Organe: Epifluoreszenz mit blauer Kernfärbung (links) und Immunhistochemie (rechts). Größenskala 50µm.

Starke Transgen-Expression war auch in Zellen des Pankreas, insbesondere im endokrinen Anteil, den Langerhans-Inseln, zu beobachten (Abbildung 25). Um die Insulin-exprimierenden Inselzellen von anderen Zellen zu unterscheiden, wurde auf dem gleichen Schnitt eine Doppelfärbung mit anti-eGFP und anti-Insulin Antikörpern durchgeführt. Auf diese Weise konnte das lentivirale Transgen eindeutig in Insulin-exprimierenden Inselzellen nachgewiesen werden (Abbildung 25).

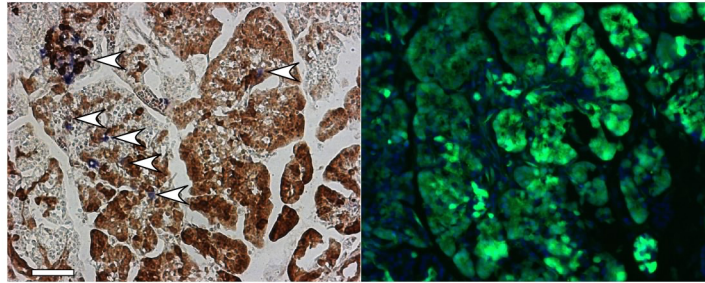


Abbildung 25. Histologische Untersuchung des Pankreas. Detektion der eGFP- und Insulin-exprimierenden Zellen im Pankreas (links) durch anti-eGFP Antikörper (braun) und anti-Insulin Färbung (blau). Pfeilköpfe, doppelt gefärbte Zellen. Epifluoreszenz mit blauer Kernfärbung (rechts). Größenskala 50µm.

Um die Expression des Transgens in verschiedenen Organen eines Tieres quantitativ zu untersuchen wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Gleiche Mengen Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und eGFP durch monoklonale Antikörper detektiert (Abbildung 26A). Die Analyse ergab, daß in allen untersuchten Organen des transgenen Schweins #511 (siehe Abbildung 19) gleiche Mengen an eGFP nachgewiesen werden konnte (Abbildung 26A).

Nachdem die Anwesenheit des Transgens im Blut bereits gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 20A), sollte nun auch die Expression untersucht werden. Hierzu wurde Vollblut in PBS verdünnt (1:1) und unfixiert für die FACS-Analyse eingesetzt. Im direkten Vergleich zu Blut eines Wildtyp-Tieres zeigte sich deutlich die Fluoreszenz der Blutzellen des LV-PGK transgenen Tieres (Abbildung 26B).

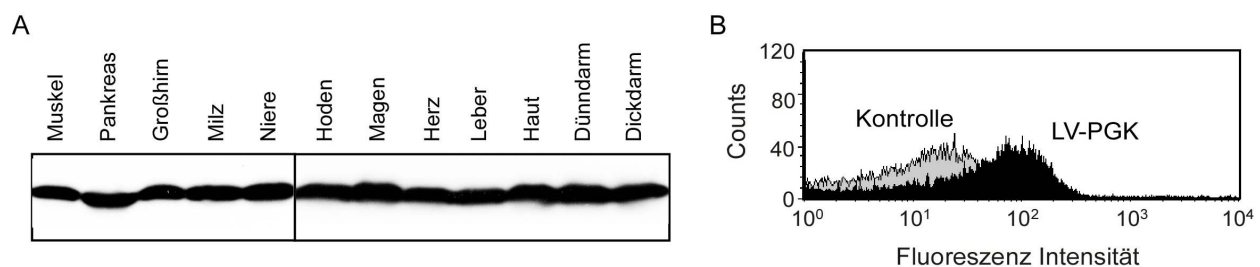


Abbildung 26. Untersuchung der eGFP-Expression von Proteinlysate und Blut. (A) Western Blot Analyse der Organe von Tier #511. (B) FACSscan von transgenem und Wildtyp-Blut.

Durch Infektion von Schweine-Zygoten konnten also transgene Tiere erzeugt werden, die das Transgen in allen untersuchten Organen exprimierten und keinen detektierbaren Mosaicismus aufwiesen (Abbildung 26A, siehe auch Kapitel 8.1.4): (i) Das Provirus war in allen Organen anwesend (Abbildung 20A). (ii) Die Anzahl und der Integrationsort der Proviren war in allen

Organen identisch (Abbildung 21B). (iii) Die Expressions-Level (Western Blot Analyse) des Transgens waren in allen Organen gleich (Abbildung 26A).

8.1.6. Einfluß der Integrantenzahl auf die Transgen-Expression

Um den Einfluß der Integrantenzahl auf die Transgen-Expression zu untersuchen, wurde von 17 transgenen Schweinen (aus den ersten 4 Trächtigkeiten, dargestellt im Southern Blot in Abbildung 19) Proteine aus Hautproben isoliert. Um sicherzustellen, daß eGFP mit dem gewählten Nachweisverfahren (Western Blot Analyse mit ECL-Detektion) im linearen Bereich detektiert wird, wurde das Proteinlysate entsprechend der Anzahl der Proviren verdünnt. Proteinlysate von Tieren mit einem Integranten wurden unverdünnt verwendet, bei Tieren mit 2 Integranten wurde das Lysat 1:2 verdünnt, usw. Die im Lysat enthaltene Menge an eGFP wurde im Western Blot (Abbildung 27A) mittels eines rekombinanten eGFP-Standards quantifiziert.

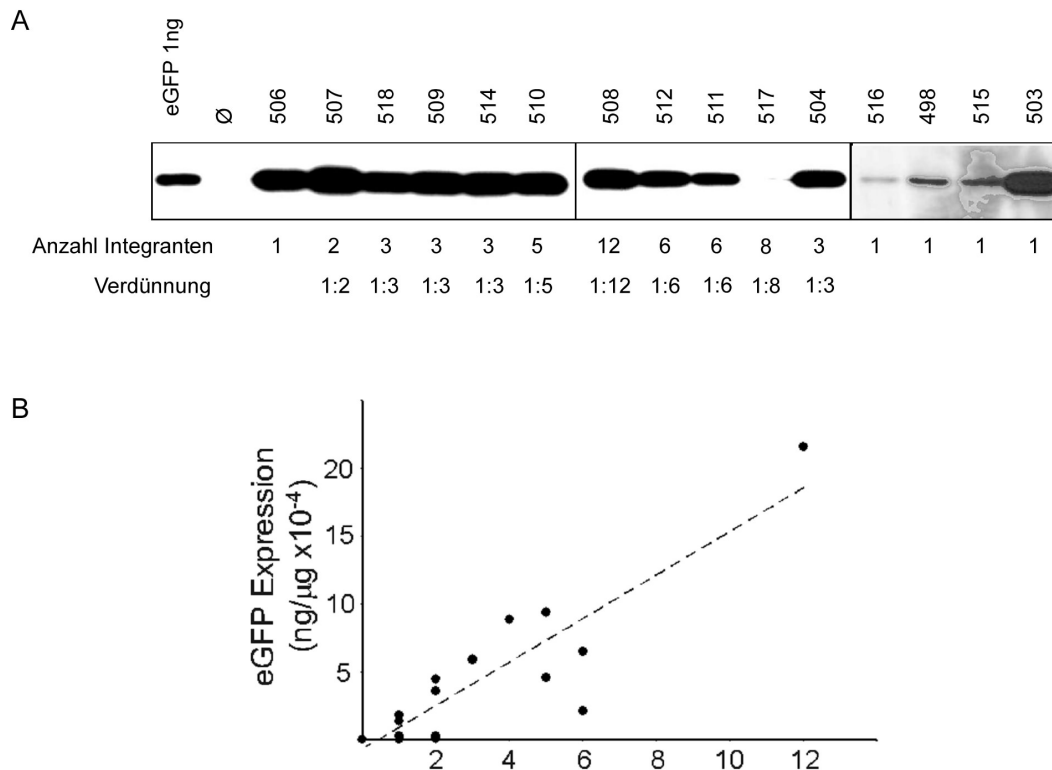


Abbildung 27. Quantifizierung der eGFP Expression und Korrelation zur Anzahl Integrantenzahl. (A) Western Blot Analyse der entsprechend der Anzahl der integrierten Proviren verdünnten Proteinproben. (B) Korrelation zwischen Transgen-Expression und Integrantenzahl.

Zur Berechnung wurden alle Proben auf β -Aktin als Loading-Kontrolle abgeglichen. Interessanterweise zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen eGFP-Konzentration und Anzahl der Kopien: Die Expression stieg mit der Integrantenzahl nahezu linear an (Abbildung 27B).

8.1.7. Statistische Auswertung

Für ein transgenes Verfahren ist die Transgenese-Rate entscheidend, also wie viele Embryonen behandelt werden müssen um ein transgenes Tier zu erzeugen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte die Effizienz des lentiviralen Gentransfers im Schwein mit entsprechenden Daten zur DNA-MI verglichen werden. Hierfür wurde ein Review von R.J. Wall verwendet, dessen statistische Angaben auf 20 Studien zu DNA-MI in Schweinen basieren (Wall, 1996).

Beim lentiviralen Gentransfer wurden nach dem Transfer von 244 Embryonen insgesamt 46 Tiere (19%) geboren (Abbildung 28). 32 davon (13% bezogen auf die manipulierten Embryonen) waren transgen (Abbildung 28). Dagegen wird mit der DNA-MI lediglich eine Effizienz von etwa 1% transgener Tiere erreicht (Wall, 1996). 30 der 32 lentiviral transgenen Tiere (12% der manipulierten Embryonen) zeigten Transgen-Expression, während dies bei der DNA-MI nur für ~0,5% der Embryonen zutrifft (Wall, 1996). Zusammenfassend ergibt sich also für den lentiviralen Gentransfer eine Effizienz von ungefähr 12% eGFP-positiven Schweinen, bezogen auf die injizierten Embryonen. Verglichen mit den ~0,5% bei der DNA-MI (Wall, 1996) bedeutet dies eine etwa 27fache Steigerung (Abbildung 28). Dadurch könnten die Kosten zur Erzeugung eines transgenen Tieres um ein Vielfaches verringert werden.

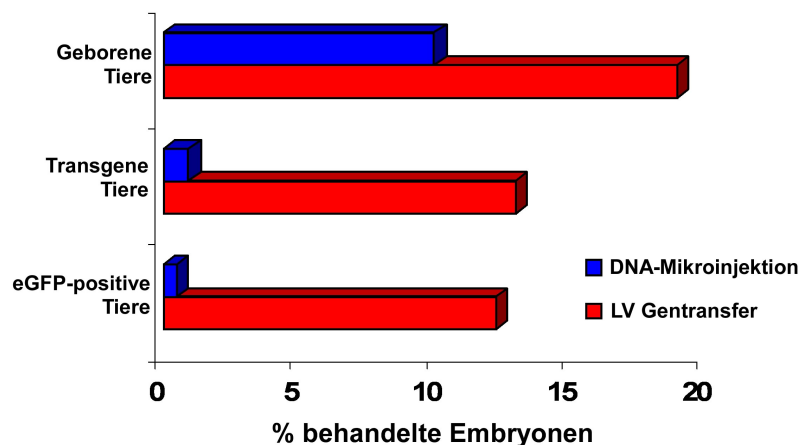


Abbildung 28. Statistische Darstellung der Effizienz des Lentiviralen Gentransfers in Schweinen im Vergleich zur DNA-MI (Wall, 1996).

8.1.8. Untersuchungen zur Keimbahntransmission des Transgens

Die Keimbahngängigkeit von Transgenen ist die Voraussetzung für die Erzeugung transgener Linien bzw. Populationen. Deshalb wurde die Frage, ob das Transgen über die Keimbahn an die nächste Generation weitergegeben wird, untersucht. Zunächst wurden männliche Fortpflanzungsorgane eines neu-geborenen Tieres makroskopisch auf eGFP-Expression untersucht. Hoden, Nebenhoden und Samenleiter zeigten starke eGFP-Fluoreszenz (Abbildung 29). Die Expression des Transgens in den Geschlechtsorganen ist ein erster Hinweis auf die Anwesenheit der lentiviralen Integrianten.

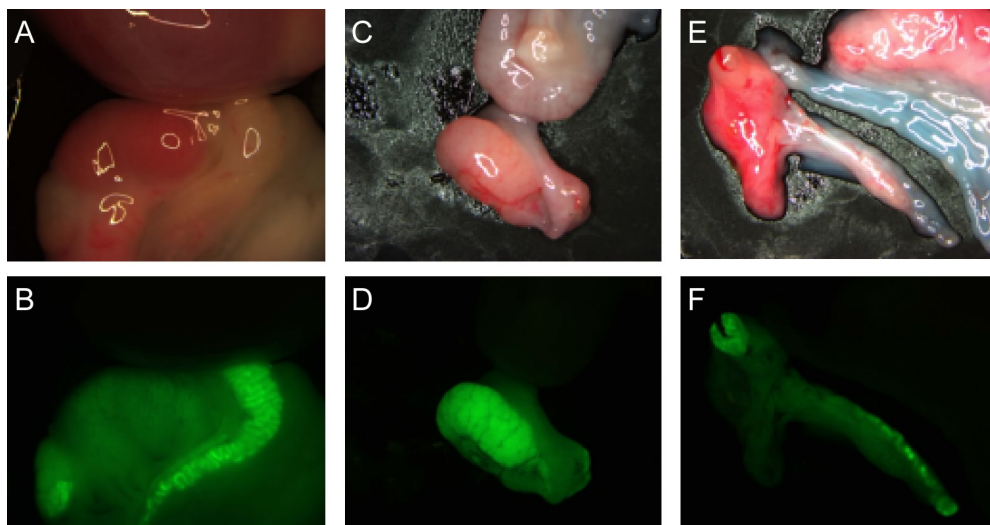


Abbildung 29. Fluoreszenz Imaging der Fortpflanzungsorgane des transgenen Schweins #511. (A und B) Transgener Hoden (unten) zeigt starke Fluoreszenz, während der entsprechenden Wildtyp-Hoden (oben) nicht fluoresziert. (C und D) Auch der Nebenhoden ist eGFP-positiv (unten). (E und F) eGFP-Expression im Samenleiter (unten). Gezeigt sind Fluoreszenz- (B, D, F) und Hellfeld-Bilder (A, C, E).

Als nächstes wurde die Transgen-Expression auf zellulärer Ebene untersucht. Eine immunhistochemische Färbung von Schnitten des Hodens und des Nebenhodens zeigte deutlich eGFP positive Zellen (braun) in den Samenkanälchen des Hodens und im Nebenhoden (Abbildung 30A und C). Zur Darstellung der Gewebestrukturen wurden konsequente Schnitte mit Hämatoxilin und Eosin (H&E-Färbung) gefärbt (Abbildung 30B, D, F).

Innerhalb der Samenkanälchen sitzen neben samenbildenden Zellen auch die Sertoli-Zellen (Stütz- oder Fußzellen) (Kühnel, 1992). Der Basalmembran eng angelagert finden sich die Spermatogonien und in der darüberliegenden Schicht die Spermatozyten I. und II. Ordnung (Prä-spermatiden), sowie die Spermatiden selbst (Kühnel, 1992).

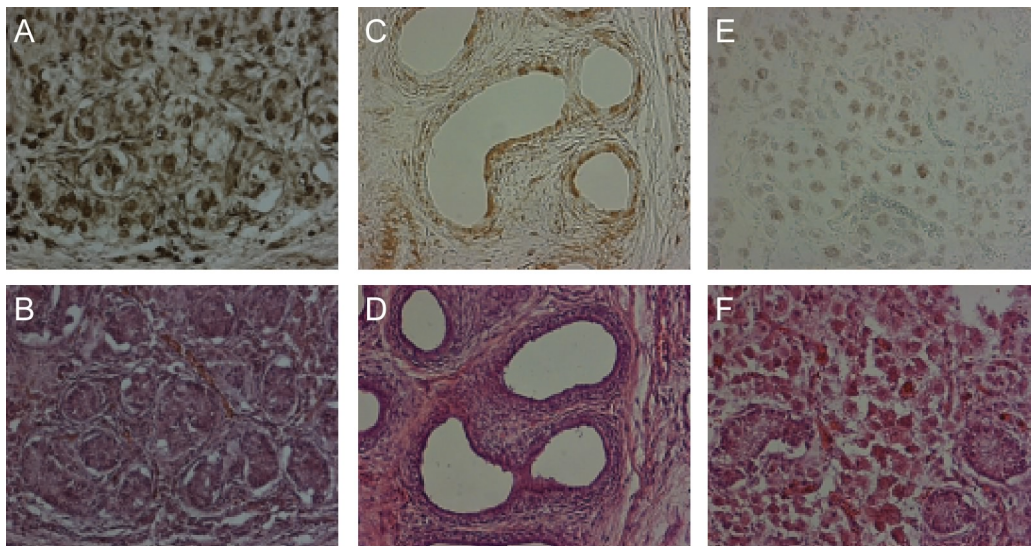


Abbildung 30. Histologische Untersuchung der Transgen-Expression im Hoden (A und B), Nebenhoden (C und D) und im Wildtyp-Hoden (E und F). Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen mit anti-eGFP Antikörpern (A, C, E) und H&E-Färbungen (B, D, F).

Um zu bestimmen welche Zellen im Hoden eGFP-positiv sind, wurde ein spezifischer Marker für Spermatogonien verwendet. Von dem Lektin *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA) konnte gezeigt werden, daß es spezifisch an Gonozyten und Spermatogonien von Rindern bindet (Ertl and Wrobel, 1992). Deshalb wurden Cryo-Schnitte mit dem TRITC-gekoppelten DBA gefärbt und auf Kolokalisation mit eGFP untersucht (Abbildung 31A). Bei den eGFP-positiven Zellen in den Samenkanälchen handelte es sich um DBA-positive Spermatogonien (Abbildung 31A). Die beobachtete eGFP-Expression ließ die Anwesenheit des Provirus in den Vorläuferzellen der Spermien vermuten. Da zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung die transgenen Schweine aufgrund ihres Alters noch nicht verpaart werden konnten, war die Transduktion der Spermatogonien ein erster Hinweis auf die Weitergabe des Transgens über die Keimbahn.

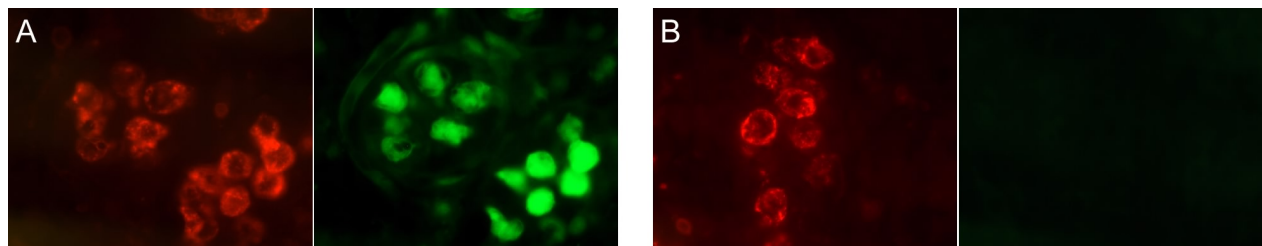


Abbildung 31. DBA-Färbung von Hodenschnitten (rot) und Analyse der Epifluoreszenz (grün) von Schnitten eines transgenen (A) und eines Wildtyp-Tieres (B).

6 Monate nach ihrer Geburt erreichen Schweine die Geschlechtsreife. Zunächst wurde von einem transgenen Eber (#507, 2 Integranten) Samen gewonnen und mittels FACS-Analyse auf eGFP-Expression untersucht. Der Samen zeigte deutliche Fluoreszenz im Vergleich zu Sperma eines gleichaltrigen Wildtyp-Ebers (Abbildung 32A).

Um die Anwesenheit des Transgens in den Spermien selbst zu zeigen, wurden diese mittels Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) mit einer eGFP-spezifischen Sonde untersucht. Zur Überprüfung der Funktionalität der Methode wurde eine für das Y-Chromosom spezifische Sonde als interne Kontrolle mitgeführt. Die mit beiden Sonden hybridisierten Spermien-Köpfe zeigten jeweils ein grünes Signal für das Y-Chromosom und rote Signale für die Anwesenheit der LV-PGK Proviren (Abbildung 32B).

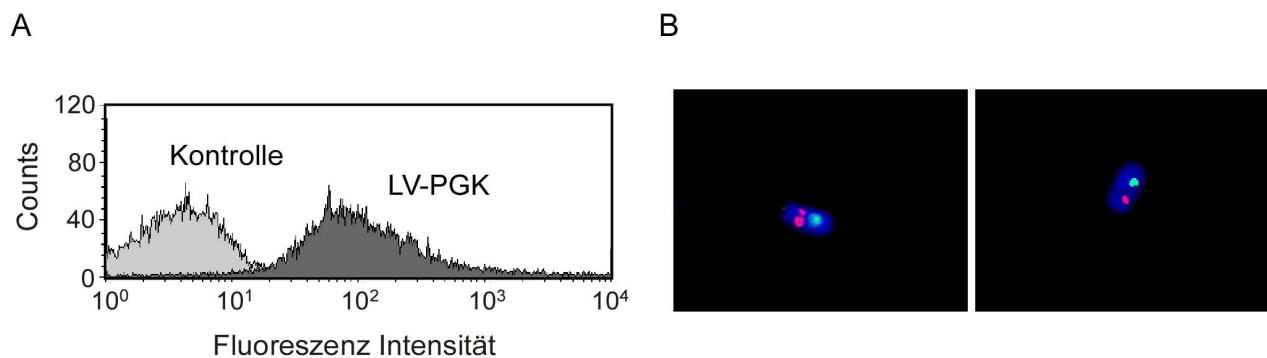


Abbildung 32. FACS- und FISH-Analyse von Sperma. (A) FACSscan von transgenem (LV-PGK) und Wildtyp-Samen. (B) FISH-Analyse von transgenen Spermienköpfen. Rote Signale für LV-PGK; grünes Signal für Y-Chromosom. (Die Fotos der FISH-Analyse wurden aufgenommen und zur Verfügung gestellt von Dr. Marc Boelhauve, Institut für Molekulare Tierzucht/ Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, München).

Anschließend wurden Wildtyp-Sauen mit dem Sperma transgener Founder befruchtet, um transgene Schweine der F1-Generation zu erzeugen. Nach 2 Tagen wurde eine Schwangerschaft terminiert und zwei bis vier-zellige Embryonen isoliert. Diese wurden mit einer nested-PCR untersucht (Abbildung 33). Dabei wurde die nachzuweisende Gen-Sequenz (eGFP) mit 2 hintereinander-geschalteten Reaktionszyklen amplifiziert (Abbildung 33A). Vier der 11 untersuchten Embryonen zeigten eindeutige eGFP-Signale in der PCR (Abbildung 33B). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, daß transgene Schweine ihre lentiviralen Integranten über die Keimbahn an die Nachkommen (F1-Generation) weitergeben können.

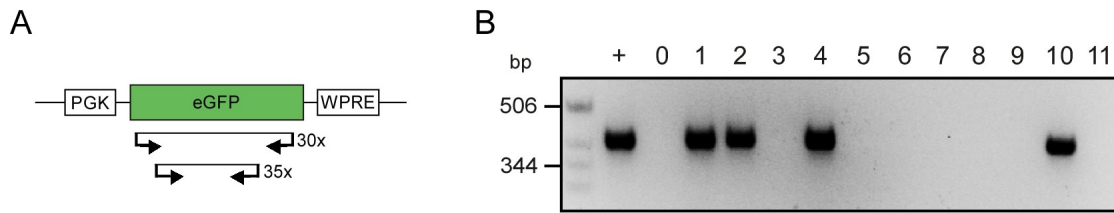


Abbildung 33. Nested-PCR von Embryonen. (A) Schematische Darstellung. Zuerst wurde eine PCR mit 30 Zyklen (äußeres Primerpaar) und anschließend 35 Zyklen (innere Primer) durchgeführt. (B) PCR-Analyse von F1-Embryonen. +, Positivkontrolle; 0, H₂O.

Nachdem auch weibliche transgene Schweine die Geschlechtsreife erreicht hatten, wurden diese mit einem Wildtyp-Eber verpaart. Nach 5 Tagen wurde auch diese Trächtigkeit beendet, die Blastozysten gewonnen und mikroskopisch auf Fluoreszenz untersucht. Von den 6 untersuchten Blastozysten zeigten 5 eGFP-Expression (Abbildung 34). Somit konnte gezeigt werden, daß LV-PGK bereits im Blastozysten-Stadium der F1-Generation exprimiert wurde.

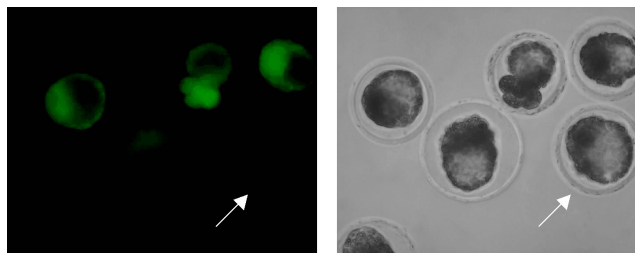


Abbildung 34. Analyse LV-PGK transgener Blastozysten. Fluoreszenz- (links) und Hellfeld-Aufnahmen (rechts). Eine eGFP-negative Blastozyste ist gekennzeichnet (Pfeil). (Die Fotos wurden aufgenommen und zur Verfügung gestellt von Dr. Barbara Kessler, Institut für Molekulare Tierzucht/Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, München).

Zur genaueren Untersuchung der Transgen-Expression während der embryonalen Entwicklung (in der F1-Generation) wurde eine weitere Trächtigkeit nach ca. 5 Wochen abgebrochen. 14 Föten (Nachkommen eines transgenen Founders mit 4 integrierten Proviren) wurden isoliert und mittels Southern Blot analysiert (Abbildung 35A). Alle Föten waren transgen und trugen mindestens einen der 4 Proviren des Vater-Tiers (Abbildung 35A). Die Integranten wurden nach den Mendel'schen Regeln über die Keimbahn an die nächste Generation weitervererbt. Die Untersuchung der Föten mittels Fluoreszenz-Imaging ergab, daß auch im fötalen Stadium der F1-Generation die lentiviralen Integranten exprimiert werden (Abbildung 35B).

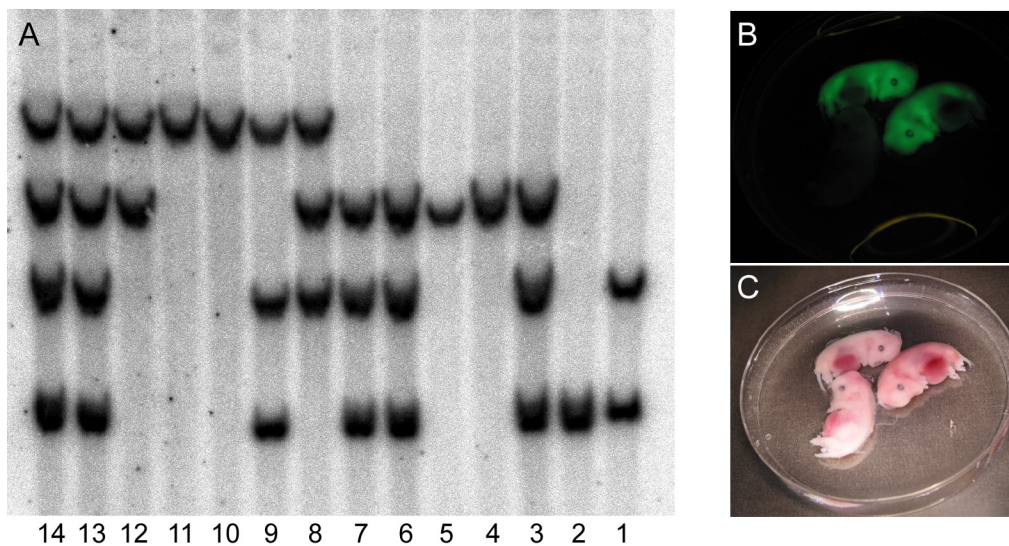


Abbildung 35. Southern Blot und Fluoreszenz-Analyse von 5 Wochen alten Föten. (A) Southern Blot Analyse von 14 Föten. (B und C) Fluoreszenz-Imaging von 2 transgenen Föten (#13 und #14, oben) und einer Kontrolle (unten). Gezeigt ist eine Fluoreszenzaufnahme (B) und das entsprechende Hellfeld-Bild (C).

Schließlich sollte untersucht werden, ob die Transgen-Expression durch den Generationswechsel von der F0- zur F1-Generation beeinflusst wird. Hierzu wurde eine Trächtigkeit ausgetragen und die F1-Nachkommen untersucht (Abbildung 36). Mittels *in vivo* Imaging konnte auch in diesen Schweinen eGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 36). Eine detaillierte Untersuchung der F1-Schweine wurde im dritten Teil dieser Arbeit im Rahmen der Untersuchung epigenetischer Regulation lentiviraler Vektoren durchgeführt (siehe ab Kapitel 8.3).



Abbildung 36. Hellfeld-Aufnahme und *in vivo* Imaging von neu geborenen Schweinen der F1-Generation.

Bei allen durchgeführten Verpaarungen konnte gezeigt werden, daß jeder einzelne lentivirale Integrant an die Nachkommen weitergegeben wurde. Dies steht im Gegensatz zu einer früheren Studie in lentiviral transgenen Mäusen (Lois *et al.*, 2002), bei der sich mindestens einer der Proviren als nicht keimbahngängig erwies.

8.1.9. Gewebespezifische Transgen-Expression in Schweinen

Die bisherigen Ergebnisse wurden mit dem ubiquitär exprimierenden PGK-Promoter erzielt. Der Einsatz von Gewebe-spezifischen Promotoren ist von Interesse für die zielgerichtete Expression von Transgenen. Solche Promotoren sind in Vertebraten chromosomal codiert und somit in allen Geweben vorhanden. Sie werden jedoch nur in bestimmten Geweben/Zellen durch Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren aktiviert. Zur Untersuchung von Gewebe-spezifischer Transgen-Expression in Schweinen wurde der ubiquitär exprimierende PGK-Promoter von LV-PGK durch den Haut-spezifischen Keratin-Promoter (K14) ersetzt. Vom K14-Promoter wurde bereits im Maus-Modell gezeigt, daß er nur in Keratinozyten, Haar-Follikeln und im oralen Epithel aktiv ist (Munz *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1989).

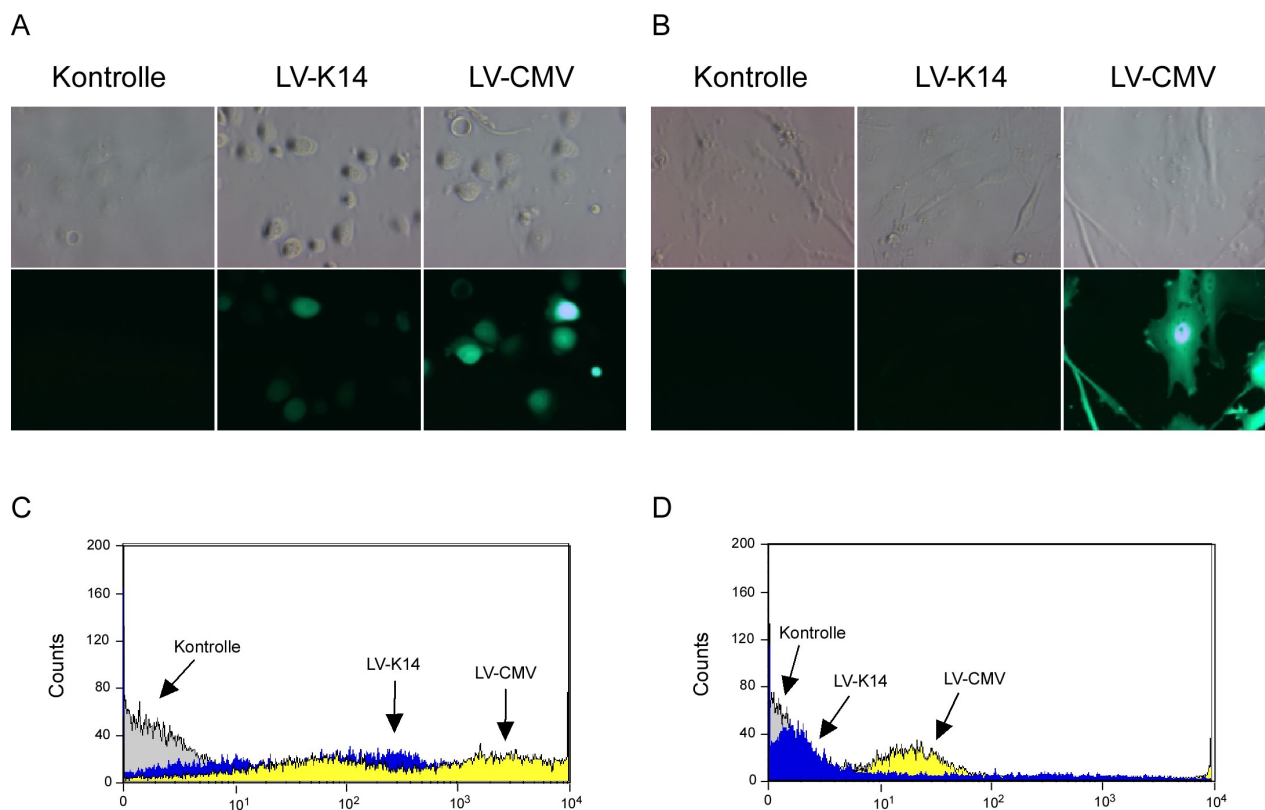


Abbildung 37. Untersuchung der Spezifität des K14-Promoters. (A und B) Fluoreszenz-mikroskopische Analyse von Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), die mit LV-K14 und LV-CMV transduziert wurden. Zu sehen sind Fluoreszenz- (unten) und Hellfeld-Aufnahmen (oben). Kontroll-Zellen zeigen keine Fluoreszenz. (C und D) FACS-Analyse der transduzierten Keratinozyten (C) und Fibroblasten (D).

Zunächst wurde die Spezifität des K14-Promoters im lentiviralen Kontext *in vitro* untersucht. Hierzu wurden 2 Zelllinien verwendet: humane Keratinozyten und Fibroblasten aus der Schweine-Haut als Negativ-Kontrolle. Beide Zelllinien wurden mit rekombinanten Lentiviren

infiziert: Das LV-K14 Konstrukt trägt eGFP unter der Kontrolle des K14-Promoters, LV-CMV trägt eine ubiquitär exprimierende CMV-eGFP Expressionskassette. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß nach Transduktion mit LV-CMV beide Zelllinien eGFP exprimierten (Abbildung 37A und B). Nach LV-K14 Infektion fluoreszierten jedoch nur die Keratinozyten (Abbildung 37A), nicht jedoch die Fibroblasten (Abbildung 37B). Die FACS-Analyse zeigte schließlich, daß der K14-Promoter in Fibroblasten nur minimal aktiviert wurde und auch im lentiviralen Kontext Keratinozyten-spezifisch exprimierte (Abbildung 37C und D).

Nachdem die Spezifität des K14-Promoters *in vitro* erfolgreich gezeigt werden konnte, wurden Präimplantationsembryonen durch subzonale Injektion von LV-K14 infiziert. Es wurden insgesamt 2 Trächtigkeiten erzeugt, die zur Geburt von 16 Schweinen führten (Tabelle 6). Zwei der 16 Tiere (#519 und #526) konnten mittels Southern Blot Analyse als transgen identifiziert werden und trugen einen bzw. drei Proviren (Tabelle 6).

Die geringere Transgenese-Rate bei LV-K14 transgenen Schweinen ist wahrscheinlich auf den geringeren Titer des verwendeten LV-K14 Virus zurückzuführen (siehe Kapitel 7.1.4). Dies zeigte sehr eindrucksvoll, wie wichtig ein hoher Virus-Titer für hohe Transgenese-Raten ist.

Tabelle 6. Transgenese-Rate und eGFP-Expression bei Verwendung von LV-K14.

Trächtigkeit	I	II	Σ
LV-K14 Embryonen	52	34	86
geborene Tiere	8	8	16
transgene Tiere	2	0	2
eGFP⁺ Tiere	2	0	2

Für die Analyse der Spezifität von LV-K14 *in vivo* wurden Organe von #526 isoliert und unfixiert mittels Fluoreszenz-Imaging untersucht. In der Haut und der Schnauze des transgenen Tieres konnte eGFP-Expression nachgewiesen werden, während alle anderen untersuchten Organe, einschließlich Kleinhirn, Niere und Pankreas keine Fluoreszenz zeigten (Abbildung 38).

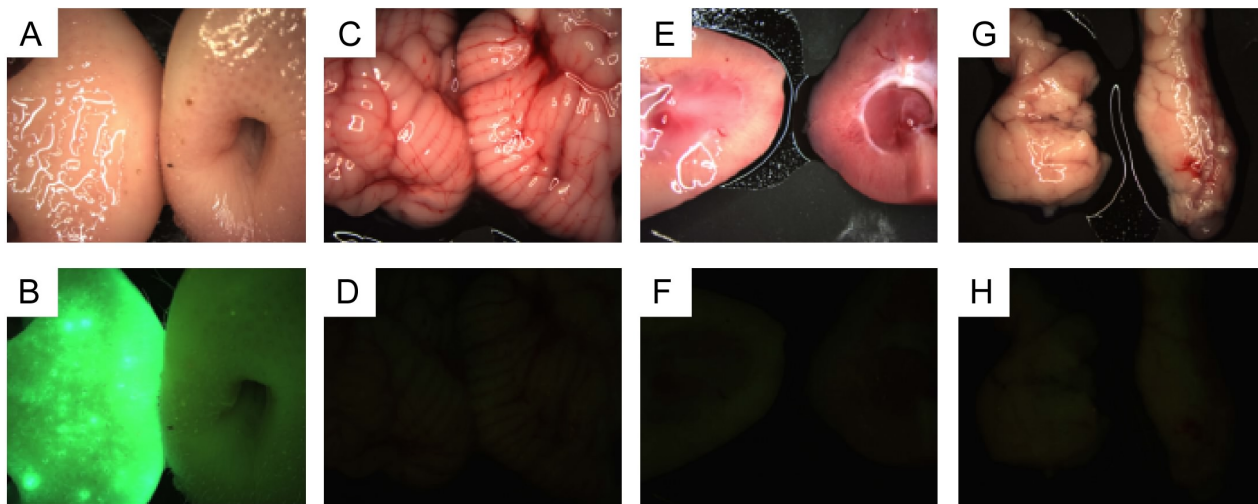


Abbildung 38. Fluoreszenz-Imaging von LV-K14 transgenen Organen. (A und B) Transgen-Expression in der Haut (Schnauze). Kleinhirn (C und D), Niere (E und F) und Pankreas (G und H), sowie alle Wildtyp-Organen zeigten keine Epifluoreszenz. Gezeigt sind Fluoreszenz (B, D, F, H) und entsprechende Hellfeld-Aufnahmen (A, C, E, G) von transgenen (links) und Wildtyp-Organen (rechts).

Anschließend wurde die Transgen-Expression auf zellulärer Ebene histologisch untersucht. Fluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten, daß die eGFP-Expression auf die basale Schicht der Epidermis und die Haar-Follikel beschränkt war (Abbildung 39A und B). Dagegen zeigten die suprabasalen epidermalen Schichten und die Dermis selbst keine Fluoreszenz (Abbildung 39A und B).

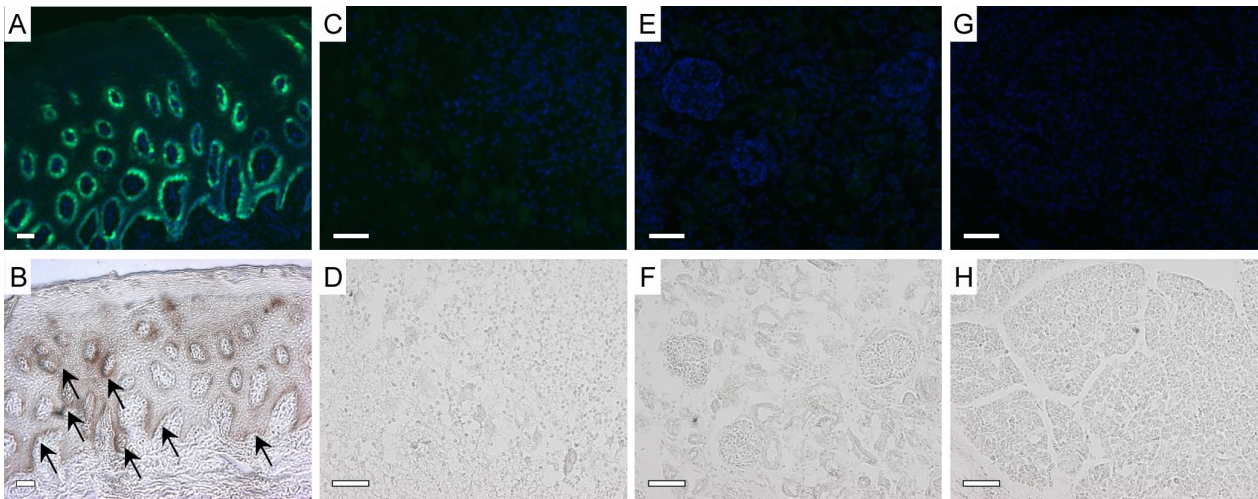


Abbildung 39. Histologische Analyse der Transgen Expression mittels direkter Fluoreszenz (A, C, E, G) und immunhistochemischer Analyse (B, D, F, H). (A und B) EGFP-Expression in der Haut. Pfeile deuten auf Schichten basaler Keratinozyten. (C und D) Analyse der eGFP Expression im Kleinhirn. (E und F) Kortikale Schnitte der Niere. (G und H) Detektion der eGFP exprimierenden Zellen im Pankreas. Gezeigt sind konsekutive Schnitte der transgenen Organe: Epifluoreszenz mit DAPI-Kernfärbung (blau, oben) und Immunhistochemie (braun, unten). Größenskala 50µm.

Schnitte des Kleinhirns (Abbildung 39C und D), kortikale Schnitte der Niere (Abbildung 39E und F) und Pankreas (Abbildung 39G und H) waren ebenfalls eGFP-negativ.

Um sicherzustellen, daß LV-K14 tatsächlich in allen untersuchten Organen vorhanden war, wurden diese mittels Southern Blot Analyse untersucht. Alle Organe von #526 zeigten eine identische Verteilung der Proviren (Abbildung 40A). Trotzdem war die eGFP-Expression spezifisch nur in der Haut zu sehen (Abbildung 40B, oben). Alle anderen Organe waren eGFP-negativ. Zum direkten Vergleich sei an dieser Stelle nochmals ein Western Blot von LV-PGK transgenen Organen (#511) gezeigt (Abbildung 40B, unten). Ganz im Gegensatz zu LV-K14 transgenen Organen ist die eGFP-Expression in allen Organen des LV-PGK transgenen Schweins identisch (Abbildung 40B, unten).

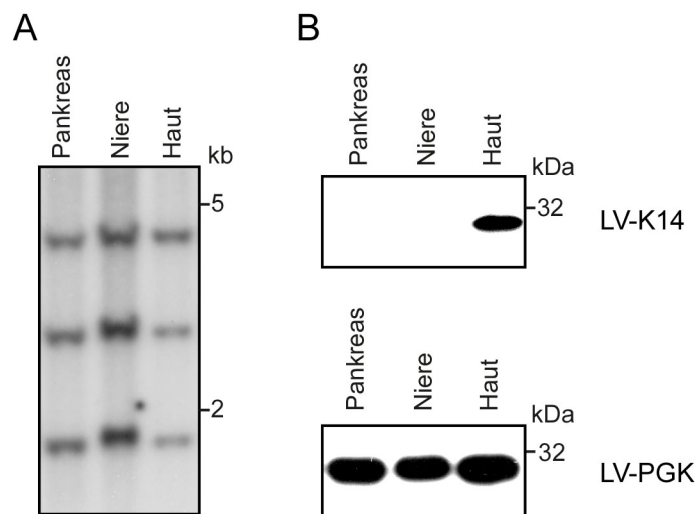


Abbildung 40. Southern und Western Blot Analyse LV-K14 transgener Organe von #526. (A) Southern Blot Analyse von Organen der 3 verschiedenen Keimblätter. (B) Western Blot Analyse der eGFP-Expression von Pankreas, Niere und Haut. Direkter Vergleich von LV-K14 (oben) und LV-PGK transgenen Organen (unten).

Damit konnte gezeigt werden, daß mittels lentiviralem Gentransfer nicht nur ubiquitäre Transgen-Expression erreicht werden kann. Durch die Wahl eines geeigneten Promoters können Gene auch spezifisch in bestimmten Geweben exprimiert werden.

8.2. Lentivirale Transgenese im Rind

8.2.1. Infektion von Rinder-Oozyten und -Zygoten

Aufgrund der hohen Effizienz der lentiviralen Transgenese im Schwein stellte sich nun die Frage, ob dieses Verfahren auch zur Erzeugung transgener Rinder eingesetzt werden kann. Transgene Rinder sind im Hinblick auf verschiedenste Anwendungen von großem Interesse. Sie könnten aufgrund ihrer hohen Milchleistung hervorragend für die Produktion therapeutischer Proteine verwendet werden (Garner and Colman, 1998). Aber auch im landwirtschaftlichen Bereich gäbe es potentielle Anwendungsmöglichkeiten für solche Tiere: Steigerung der Wachstumsraten, Verbesserung der Fleisch-Zusammensetzung (Pursel, 1998), verbesserte Milchförderung (Zuelke, 1998), gesteigerte Reproduktion sowie verbesserte Krankheits-Resistenzen und Immunabwehr (Muller and Brem, 1998).

Analog zur Vorgehensweise bei Schweinen wurden insgesamt 227 Rinder-Zygoten (vier Experimente) subzonal mit LV-PGK infiziert. Nach *in vitro* Kultur entwickelten sich 76 Embryonen zu Blastozysten (Tag 7), wobei $45\% \pm 22\%$ dieser Blastozysten schwache Epifluoreszenz zeigten (Abbildung 41, links). Insgesamt wurden 17 dieser vermeintlich eGFP-positiven Blastozysten in 10 Empfänger transferiert. Aus diesem Ansatz wurden vier Tiere geboren und mittels Southern Blot untersucht. Überraschenderweise war keines der vier Tiere transgen.

Deshalb wurde zur Infektion von Oozyten, also vor der *in vitro* Befruchtung, gewechselt. Oozyten befinden sich in einem Metaphase II-Arrest der zweiten Meiose und haben keine Kernmembran um das genetische Material. Obwohl Lentiviren in der Lage sind die Kernmembran einer Zelle zu überwinden, könnte die Integration ins bovine Genom in Abwesenheit einer solchen Membran möglicherweise erleichtert werden. Die subzonale Injektion von LV-PGK in 48 bovine Oozyten resultierte in 83% eGFP-positiven Blastozysten (Abbildung 41, rechts). Die Effizienz der Oozyten-Injektion war demnach signifikant höher als bei der Transduktion von Zygoten. Des weiteren war auch die Fluoreszenzintensität der aus Oozyten-Manipulation stammenden Blastozysten deutlich stärker (Abbildung 41).

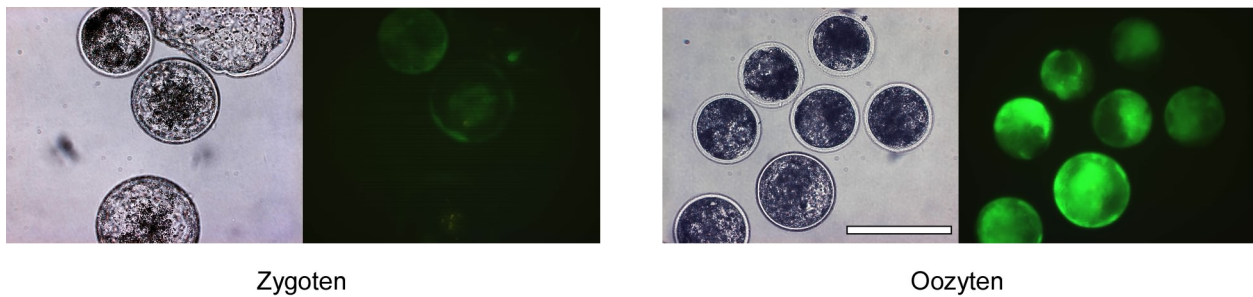


Abbildung 41. Analyse der Transgen-Expression von Blastozysten (Tag-7) nach Transduktion von Zygoten (links) und Oozyten (rechts) mit LV-PGK. (Die Fotos wurden aufgenommen und zur Verfügung gestellt von Myriam Weppert, Institut für Molekulare Tierzucht/Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, München).

Um die Lokalisation des Transgens zu untersuchen, wurden Blastozysten aus Zygoten- und Oozyten-Injektion konfokalmikroskopisch untersucht (Abbildung 42). Die eGFP-Expression war sowohl in der äußeren Zellschicht, wie auch in der inneren Zellmasse zu sehen.

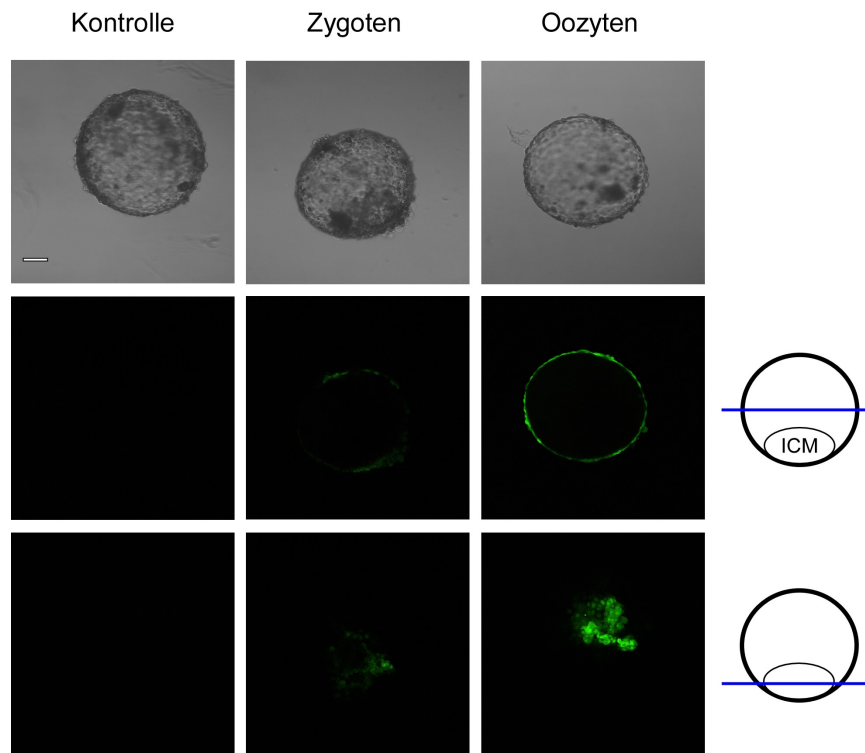


Abbildung 42. Konfokale Aufnahmen von Blastozysten (Tag-7) aus Zygoten- und Oozyten-Injektionen. Gezeigt sind Hellfeld-Aufnahmen (oben) und Fluoreszenz-Aufnahmen durch das Zentrum der Blastozyste (mitte) und die innere Zellmasse (unten). Wildtyp-Blastozysten zeigen keine Epifluoreszenz.

Auch bei Kultivierung der aus Oozyten-Injektion stammenden Blastozysten über den 7. Tag hinweg war die Transgen-Expression nachweisbar. Nach dem Schlüpfen der Blastozysten aus der Zona Pelluzida waren alle Zellen eGFP-positiv (Abbildung 43). Somit konnte die

Expression des Transgens in der äußeren Zellschicht, der inneren Zellmasse (Abbildung 42) und in embryonalen Zellen nach dem Schlüpfen der Blastozyste aus der Zona (Abbildung 43) nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, daß die Expression des lentiviralen Provirus während der embryonalen Entwicklung einer LV-PGK infizierten Oozyte stabil ist.

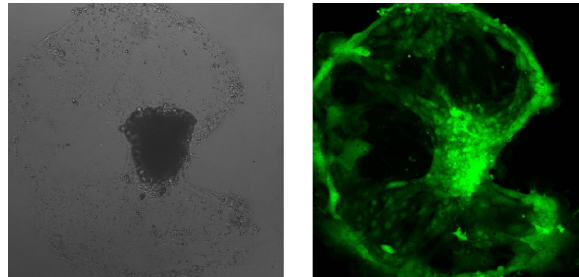


Abbildung 43. Konfokale Aufnahme einer aus Oozyten-Injektion stammenden Blastozyste nach dem Schlüpfen aus der Zona Pelluzida.

8.2.2. Analyse der geborenen Tiere

Acht eGFP-positive Blastozysten (aus Oozyten-Injektionen) wurden in vier Empfänger transferiert. Die drei daraus resultierten Trächtigkeiten wurden ausgetragen und führten zur Geburt von vier gesunden Rindern. Alle geborenen Kälber (zwei männliche und zwei weibliche) wurden mittels *in vivo* Fluoreszenz-Imaging auf eGFP-Expression untersucht und zeigten starke Fluoreszenz an Schnauze, Hufen und Augen (Abbildung 44).

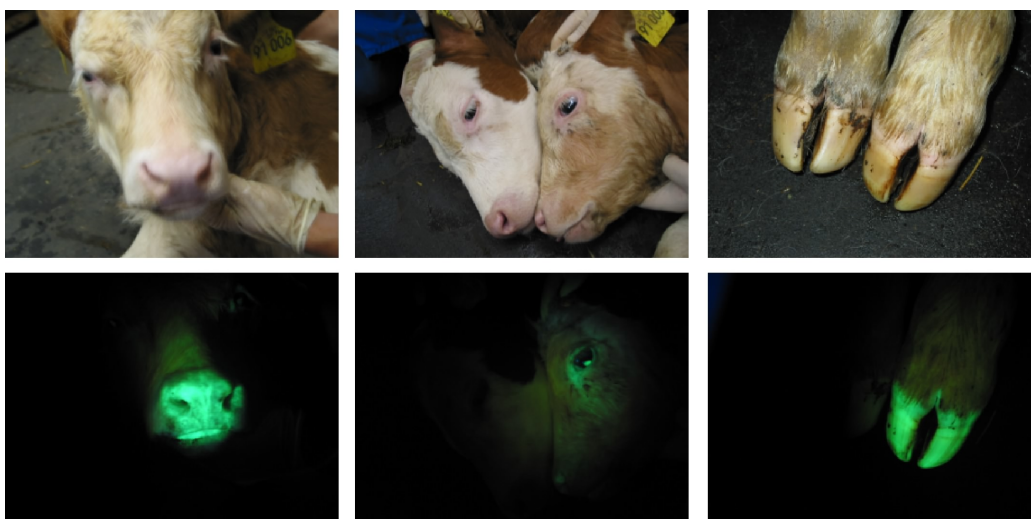


Abbildung 44. *In vivo* Fluoreszenz-Imaging lentiviral transgener Rinder. Schnauze, Klauen und Auge zeigen Expression des eGFP-Reporters. Gezeigt sind Fluoreszenz- (unten) und Hellfeld-Aufnahmen (oben). Auf den mittleren und rechten Bildern ist zusätzlich ein Wildtyp-Kalb (linke Bildhälfte) zum direkten Vergleich gezeigt.

Als nächstes wurde genomische DNA mittels Southern Blot auf die Anzahl der integrierten Viren untersucht. Alle 4 Kälber trugen mehrere Proviren (zwischen 5 und ~15) (Abbildung 45A). Die Anzahl und Verteilung der Proviren war in den verschiedenen untersuchten Organen eines Tieres identisch (Abbildung 45B).

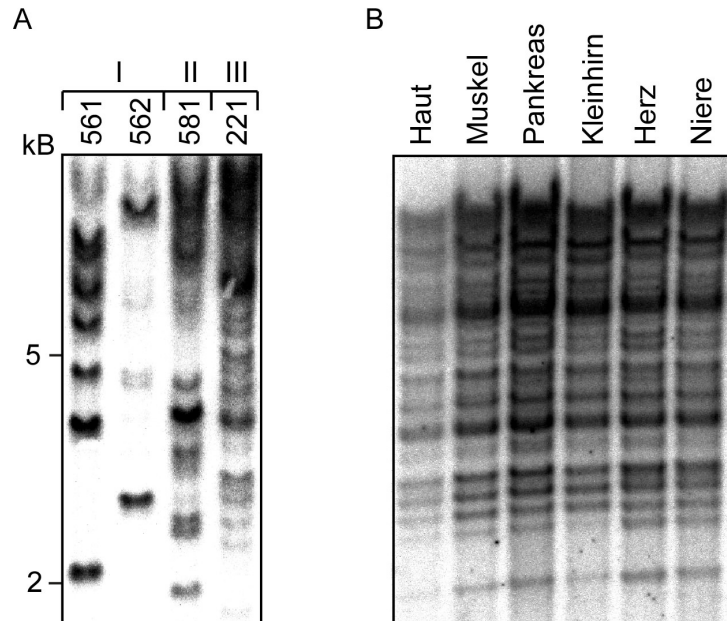


Abbildung 45. Southern Blot Analyse der aus Oozyten-Injektionen abstammenden Rindern. (A) Die aus den 3 Trächtigkeiten (I-III) geborenen Rinder trugen multiple provirale Integrianten. (B) Verteilung der Proviren in verschiedenen Organen eines Tieres (#221).

Die beim *in vivo* Imaging beobachtete eGFP-Expression sollte nun mittels Western Blot Analyse von Hautproben verifiziert werden. Wie erwartet, zeigten alle vier Rinder Expression des Transgens (Abbildung 46A). Für den Einsatz transgener Rinder im Bereich "Gene-Farming" wäre jedoch eine dauerhafte und stabile Transgen-Expression essentiell. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde von zwei transgenen Rindern kurz nach der Geburt und fünf Monate später Protein aus Hautproben gewonnen und die eGFP-Expression quantifiziert (Abbildung 46B). Nach fünf Monaten war die eGFP-Expression immer noch genauso hoch wie kurz nach der Geburt (Abbildung 46B). Die Expression lentiviraler Vektoren im Rind war also zumindest im untersuchten Zeitraum (5 Monate) stabil.

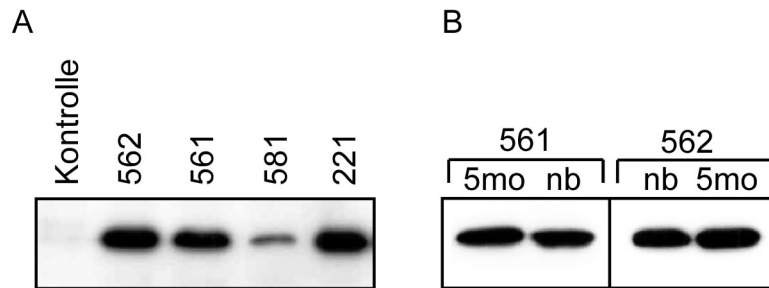


Abbildung 46. Western Blot Analyse der eGFP-Expression (A) EGFP-Expression in Haut-Proben der vier transgenen Rinder. (B) Analyse der Langzeit-Transgenexpression zweier transgener Rinder (#561 und #562). Vergleich der Expression kurz nach der Geburt (nb) und fünf Monate später (5mo).

Für die histologische Analyse wurden Organe von #581 (männlich) und #221 (weiblich) entnommen. Zunächst wurden diese unfixiert mittels Fluoreszenz-Stereomikroskopie untersucht. Haut, Pankreas und Niere (Derivate der 3 Keimblätter) zeigten starke eGFP-Expression (Abbildung 47, oben). Anschließend wurde die Transgen-Expression von #221 auch auf zellulärer Ebene untersucht. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und immunhistochemischer Färbungen konnte die Expression des Transgens in allen Organen, einschließlich Haut, Pankreas und Niere (Abbildung 47, mitte) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers und der Eigenfluoreszenz wurden Kontrollschnitte von Wildtyp-Organen identisch behandelt (Abbildung 47, unten).

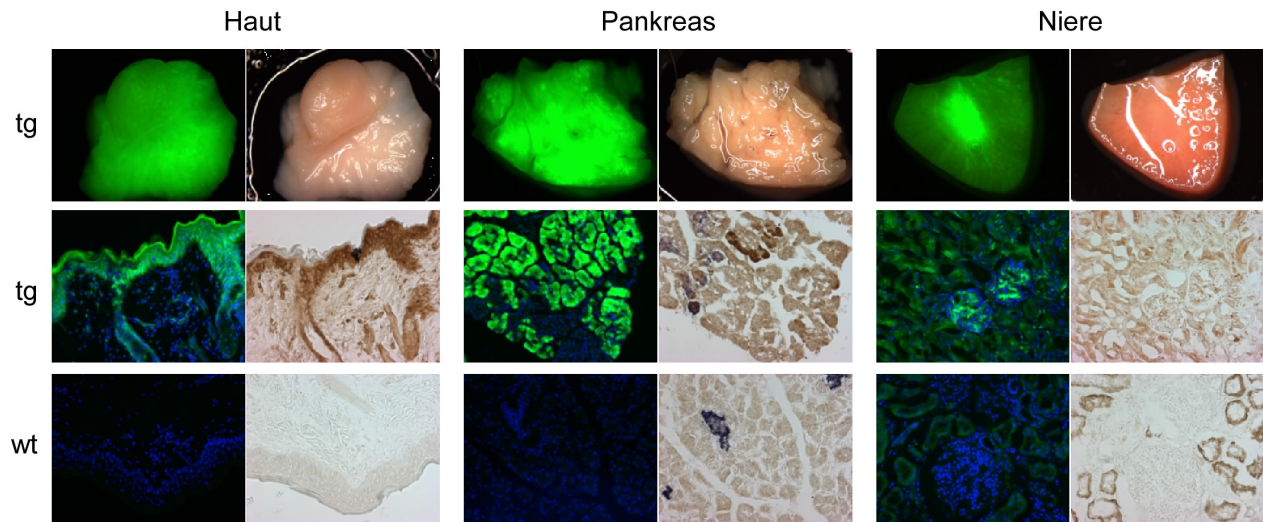


Abbildung 47. Fluoreszenz-Imaging und Immunhistochemie von Haut, Pankreas und Niere. (Oben) Makroskopische Fluoreszenzaufnahmen (jeweils links) und entsprechende Hellfeld-Bilder (jeweils rechts) von Organen des Tieres #221. (Mitte) Histologische Analyse der repräsentativen Organe. Epifluoreszenz (jeweils links) und Immunhistochemie mit anti-eGFP Antikörpern (braune Färbung, jeweils rechts). Pankreas-Schnitte sind zusätzlich mit anti-Insulin Antikörpern (blau) gefärbt. (Unten) Entsprechende Kontroll-Schnitte eines Wildtyp-Rindes.

8.2.3. Keimbahntransmission

Aufgrund der langen Trächtigkeiten (9-10 Monate) und der Dauer bis zur Geschlechtsreife (die Pubertät tritt erst nach 8-11 Monaten ein, die Zuchtreife nach 14-18 Monaten) war der direkte Nachweis der Keimbahntransmission bei Rindern bisher noch nicht möglich. Deshalb wurden männliche und weibliche Geschlechtsorgane der transgenen Rinder untersucht.

Die makroskopische Untersuchung der Ovarien von Kuh #221 offenbarte starke Fluoreszenz (Abbildung 48A, oben). Auch immunhistochemische Untersuchungen zeigten eGFP-Fluoreszenz im ganzen Gewebe (Abbildung 48A, unten). Die Untersuchung des Hodens eines Founder-Bullen (#581) ergab, daß sich innerhalb der Hodenkanälchen eGFP-positive Zellen befinden (Abbildung 48B, oben). Zur Untersuchung, um welche Zellen es sich dabei handelte, wurde erneut der spezifische Marker für Spermatogonien (DBA) verwendet (Ertl and Wrobel, 1992) (Siehe auch Kap. 1.8 und Abbildung 31). Mit Hilfe dieses Färbeverfahrens konnte gezeigt werden, daß es sich bei den grün fluoreszierenden Zellen um Spermatogonien handelte (Abbildung 48B, unten).

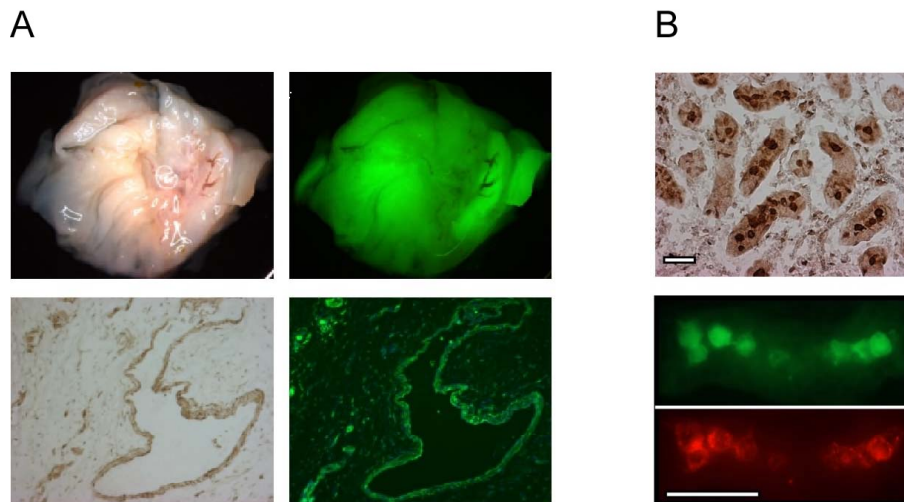


Abbildung 48. Untersuchung der Transgen-Expression in den Geschlechtsorganen. (A) Die Ovarien der transgenen Kuh #221 zeigten sowohl makroskopisch (oben, Hellfeld- und Fluoreszenz-Aufnahme), wie auch auf zellulärer Ebene (unten, Immunhistochemie und Epifluoreszenz) eGFP-Expression. (B) Die Hoden eines transgenen Bullen (#581) zeigten eGFP-positive Zellen in den Hodenkanälchen (oben). Färbung mit einem spezifischen Marker für Spermatogonien (DBA, rot) identifizierte die eGFP-positiven Zellen als Spermatogonien (unten).

8.2.4. Transgen-Expression im Milchdrüsengewebe

Transgen-Expression im Rinder-Euter ist die Basis für die Produktion von rekombinanten Proteinen in Milch und der erfolgreichen Nutzung von Rindern als sog. Bioreaktoren (Bremel *et*

al., 1989; Maga and Murray, 1995). Durch Promotoren und regulatorische Komponenten von Genen die für Milchproteine codieren, ist es möglich Transgene in der Milchdrüse zu exprimieren, welche dann über die Milch sezerniert werden (Clark, 1998). Auch die Zusammensetzung der Milch selbst kann durch gezielte Modifikation des Wirts-Genoms beeinflusst werden, wie zum Beispiel der Fettgehalt von Ziegen-Milch (Reh *et al.*, 2004) oder der Casein-Level in Kuhmilch (Brophy *et al.*, 2003). Zunächst wurde das Milchdrüsengewebe der transgenen Kuh #221 makroskopisch mit dem Stereomikroskop untersucht (Abbildung 49A). Für eine detaillierte histologische Untersuchung wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt und die direkte Fluoreszenz untersucht. Alle Bereiche des Gewebes, besonders aber die Milchkanälchen, zeigten die Expression des Transgens (Abbildung 49B).

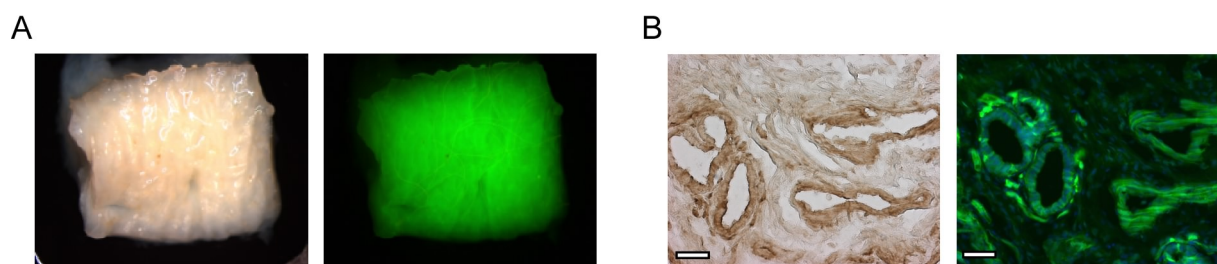


Abbildung 49. EGFP-Expression im Milchdrüsengewebe von Tier #221. (A) Makroskopische Fluoreszenzanalyse. Hellfeld-Aufnahme (links) und Fluoreszenz-Aufnahme (rechts). (B) Histologische Untersuchung von Schnitten des Euters. Immunhistochemische Färbung (braun, links) und Epifluoreszenz-Aufnahme (rechts).

8.2.5. Statistische Auswertung

Nach Transfer von lediglich 8 Embryonen wurden vier Kälber geboren, die alle das Transgen trugen und exprimierten (50% bezogen auf die injizierten und transferierten Embryonen). Dies stellte eine enorme Effizienz-Steigerung im Vergleich zur DNA-MI (~0,7% der transferierten Embryonen) dar (Wall, 1996). Ganz im Gegensatz dazu steht eine frühere Studie, in der Oozyten mit prototypischen Retroviren (basierend auf MuLV) infiziert wurden (Chan *et al.*, 1998). Nach Transfer von 10 Blastozysten wurden zwar vier transgenen Rinder geboren (Chan *et al.*, 1998), allerdings konnte nur in einem eine schwache Expression des Transgens (Hepatitis B Oberflächenantigen, HBsAg) nachgewiesen werden (Chan *et al.*, 1998). Die hohe Effizienz des lentiviralen Gentransfers konnte unter anderem erreicht werden, weil eGFP-positive Blastozysten vor dem Embryonaltransfer selektiert werden konnten. Allerdings waren nach subzonaler Injektion von LV-PGK in bovine Oozyten 83% der Blastozysten eGFP-positiv. Derart hohe

Effizienzen würden es ermöglichen auch Transgene zu verwenden, die keine Selektion vor dem Embryonaltransfer erlauben.

8.2.6. Erzeugung lentiviral transgener Rinder durch Kerntransfer

Der Kerntransfer (NT) bietet die Möglichkeit Zellkerne von bereits differenzierten Zellen durch Transfer in entkernte Eizellen zu bringen und so transgene Tiere mit gezielt modifiziertem Erbgut zu erzeugen (Wolf, 2003). Dieses Verfahren sollte als eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung transgener Tiere durch lentiviralen Gentransfer untersucht werden. Beim NT wird der Zellkern einer Spenderzelle (Karyoplast) in das Zytoplasma einer Empfängerzelle (Zytoplast) übertragen (Abbildung 50). Zuvor muß allerdings der Nukleus aus der Empfängerzelle entfernt werden (Abbildung 50). Als Empfängerzellen werden meist Eizellen in der Metaphase der zweiten Reifeteilung (Oozyten) verwendet (Review in: (Campbell, 1999)). Zum Transfer des Zellkerns werden kurzzeitige Gleichstromimpulse angelegt (Elektrofusion), wobei die Zellmembranen von Karyoplast und Zytoplast verschmelzen, die Zytoplasma-Anteile zusammenfließen und schließlich der Spender-Zellkern übertragen wird (Wolf, 2003).

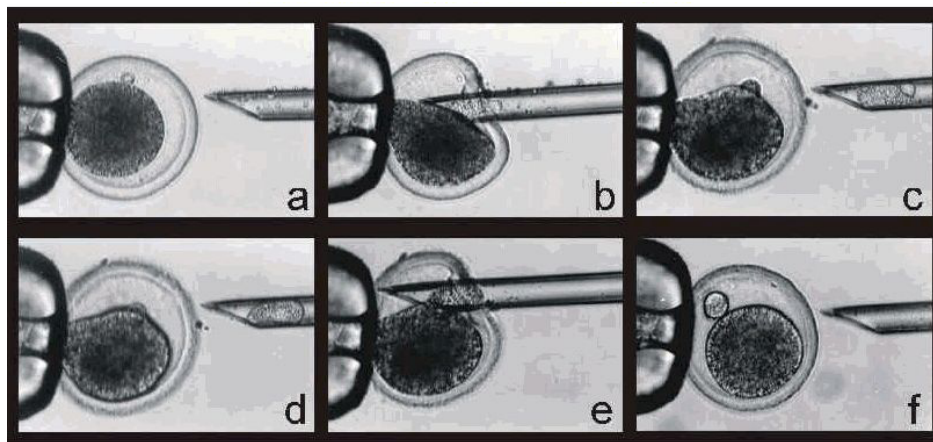


Abbildung 50. Darstellung des Kern-Transfers. (a-c) Aus dem Zytoplast wird das genetische Material mit einer Mikropipette abgesaugt. (d-f) Der Zellkern der Spenderzelle wird in das Zytoplasma einer Empfängerzelle übertragen. (Grafik aus (Wolf, 2003)).

Haut-Fibroblasten vom Rind wurden als Spender-Zellen für den Kerntransfer verwendet. Nach Infektion dieser Fibroblasten mit LV-PGK wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 51A). Die FACScan-Analyse zeigte, daß über 85% der Fibroblasten transduziert waren (Abbildung 51B). Aufgrund dieser hohen Transduktionsraten wurden NT-

Embryonen ohne vorherige Selektion der Spender-Zellen erzeugt. Dies war von besonderem Interesse, da beim NT häufig Spenderzellen aus Primärkulturen verwendet werden. Diese können nur begrenzt passagiert werden, was eine Prä-Selektion erschwert.

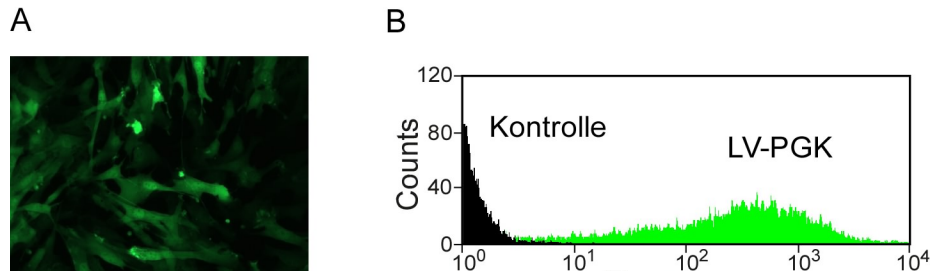


Abbildung 51. LV-PGK transduzierte Fibroblasten vom Rind. Fluoreszenzaufnahme (A) und FACSscan Analyse (B).

Insgesamt wurden 214 NT-Embryonen erzeugt. 36% der Embryonen (76) entwickelten sich nach einer Woche in Kultur zu Blastozysten. 56 dieser Blastozysten wurden in 31 Empfänger transferiert, woraus initial fünf Trächtigkeiten entstanden. Leider wurden vier der Trächtigkeiten verloren. Dennoch wurde ein gesundes Kalb (#991, weiblich) auf natürliche Weise geboren (Transgenese-Rate ~2%). Beim NT von nicht-infizierten Fibroblasten-Kernen wurden vergleichbare Effizienzen und Abort-Raten beobachtet (Zakhartchenko *et al.*, 1999).

Das geborene Kalb wurde zunächst mittels *in vivo* Imaging auf eGFP-Expression untersucht. Alle Körperteile zeigten Fluoreszenz, einschließlich Haut, Schnauze und Augen (Abbildung 52A). Zur weiterführenden Untersuchung wurden dem Tier Organe entnommen. Die Histologie zeigte Transgen-Expression in allen untersuchten Organen. Beispielfhaft seien an dieser Stelle histologische Schnitte der Haut gezeigt (Abbildung 52B). Des weiteren wurden verschiedene Organe mittels Southern Blot untersucht (Abbildung 52C). Das NT-Tier #991 trug insgesamt 6 Integranten in seinem Genom. Die Anzahl und der Integrationsort der Proviren war in allen untersuchten Geweben identisch (Abbildung 52C). Lentiviraler Gentransfer bei Rind war also auch über den "Umweg" der lentiviralen Infektion von Spenderzellen und anschließendem Kerntransfer erfolgreich.

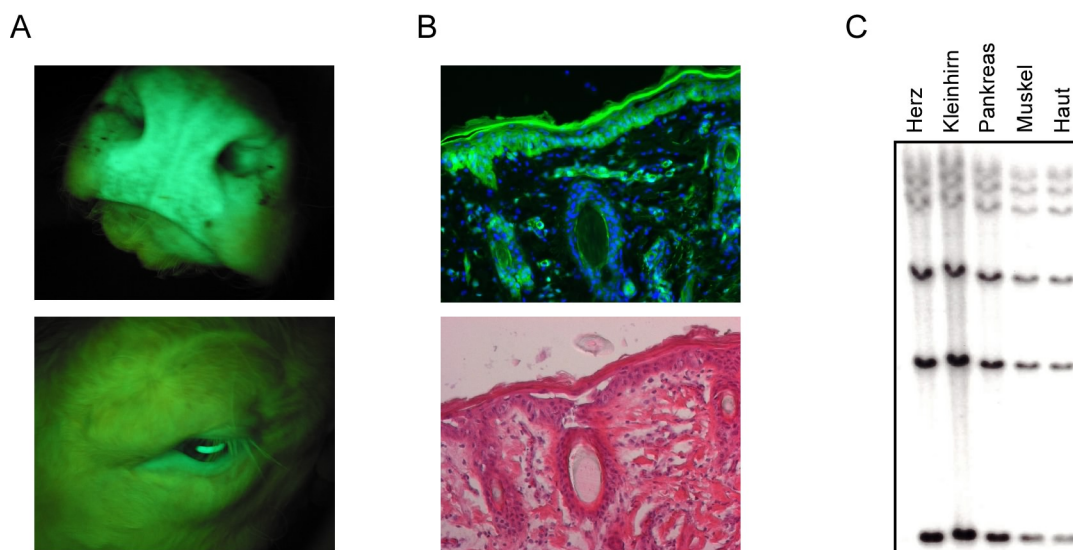


Abbildung 52. Untersuchung des geklonten Rindes #991. (A) *In vivo* Imaging am lebenden Tier zeigte eGFP-Expression in Haut, Schnauze und Auge. (B) Immunhistochemische Untersuchung der Transgen-Expression in der Haut mittels Fluoreszenzmikroskopie (oben). Zur Darstellung der Gewebestruktur wurde ein konsekutiver Schnitt H&E gefärbt (unten). (C) Southern Blot Analyse der Organe des Tieres.

8.3. Epigenetische Regulation lentiviraler Transgen-Vektoren

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation lentiviraler Vektoren in transgenen Tieren. Von prototypischen Retroviren (z.B. MuLV) ist hinreichend bekannt, daß diese während der Embryogenese oder kurz nach der Geburt epigenetisch gesilencet und weder in der F0- noch in der F1-Generation exprimiert werden (Chan *et al.*, 1998; Jaenisch, 1976; Jahner *et al.*, 1982; Laker *et al.*, 1998). Die Analyse dieser gesilenceten retroviralen Genome zeigte *de-novo* Methylierung von CpG-Nukleotiden (Jahner *et al.*, 1982; Laker *et al.*, 1998). Es sollte nun untersucht werden, ob lentivirale Vektoren *in vivo* den gleichen Silencing-Mechanismen unterliegen wie retrovirale Vektoren. Bednarik *et al.* konnten zeigen, daß die LTRs von HIV-1 in Säugetier-Zellen methyliert wurden, was einen Einfluß auf die Expression von Lentivektoren haben könnte (Bednarik *et al.*, 1990). Moderne lentivirale Vektoren besitzen allerdings transkriptionell inaktive LTRs mit SIN-Deletionen (Miyoshi *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1998). Deshalb sind sie möglicherweise nicht Ziel dieser epigenetischen Mechanismen (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Außerdem könnte der Integrationsort die transkriptionelle Aktivität der Lentivektoren beeinflussen (Hino *et al.*, 2004; Mohamedali *et al.*, 2004; Ramezani *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2004).

8.3.1. Variationen im Expressions-Level verschiedener Integranten

Um die epigenetische Regulation und potentiell Silencing lentiviraler Vektoren zu untersuchen, werden Zellen oder Tiere mit Einzel-Integranten benötigt (Ellis and Yao, 2005). Bei den meisten lentiviral transgenen Tieren (F0-Generation) findet man jedoch multiple provirale Integranten, wodurch Silencing eines Teils der Proviren nicht identifiziert werden könnte. Zur Untersuchung individueller Integranten wurden drei eGFP-exprimierende Founder (#8507, #8514, und #8506, siehe Abbildung 19) mit Wildtyp-Schweinen verpaart. Die Southern Blot Analyse der F1-Nachkommen (#8774 - #8793 und #9031 - #9036) zeigte, daß die sechs lentiviralen Integranten (*a - f* in Abbildung 53) unabhängig voneinander weitervererbt wurden. Von den 26 geborenen Tieren der F1-Generation trugen 12 Einzel-Integranten (unterstrichen in Abbildung 53).

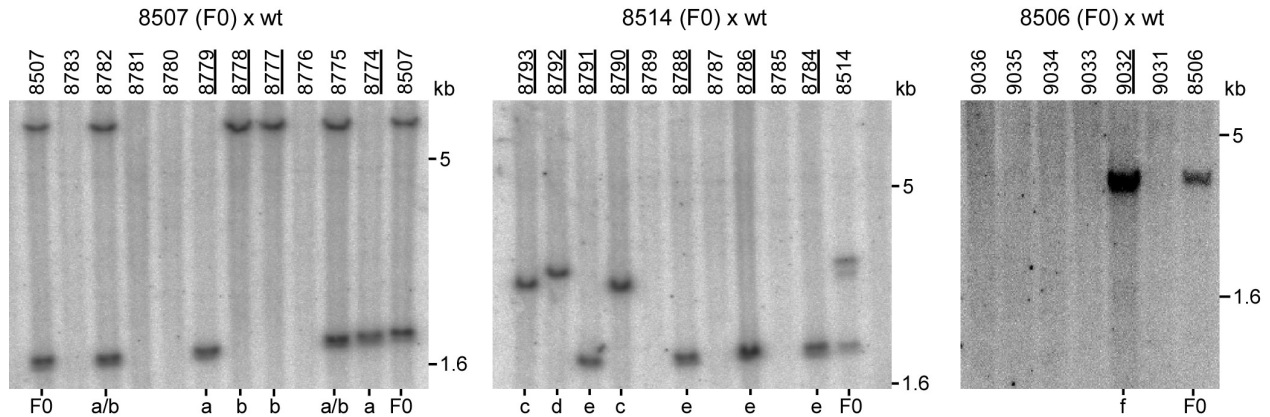


Abbildung 53. Southern Blot Analyse transgener Founder (#8507, #8514 und #8506) und Ferkel der F1-Generation. Es können sechs unabhängige Integranten (*a - f*) unterschieden werden.

Mittels Western Blot Analysen wurde die eGFP-Expression quantifiziert und gegen β -Aktin als Loading-Kontrolle abgeglichen (Abbildung 54). Der transgene Founder, von dem der Wurf abstammte, wurde jeweils zum direkten Vergleich mituntersucht. Die Expressionsanalyse demonstrierte signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Einzel-Integranten (Abbildung 54). Die Mehrzahl der Tiere zeigte mittlere (Integranten *c*, *d* und *f*) bis hohe eGFP-Expression (Integrand *b*). Allerdings konnten auch Tiere identifiziert werden, die nur schwache bzw. mittels Western Blot nicht detektierbare Transgen-Expression aufwiesen (Integranten *a* und *e*) (Abbildung 54).

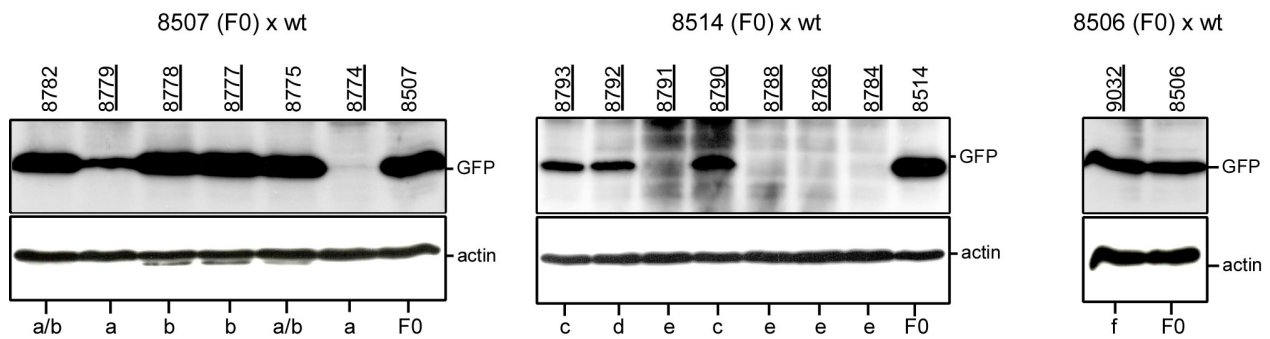


Abbildung 54. Western Blot Analyse transgener Founder (#8507, #8514 und #8506) und F1-Ferkel. Als Loading-Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die individuellen Integranten sind gekennzeichnet mit *a - f*.

Von den Tieren #8774, #8784, #8786, #8788 und #8791 wurde die eGFP-Expression mittels RT-PCR (Reverse Transkription-PCR) analysiert. Hierzu wurde mRNA in cDNA umgeschrieben. Die darauffolgende PCR-Analyse zeigte Transkripte des Transgens in allen 5 Tieren (Abbildung 55).

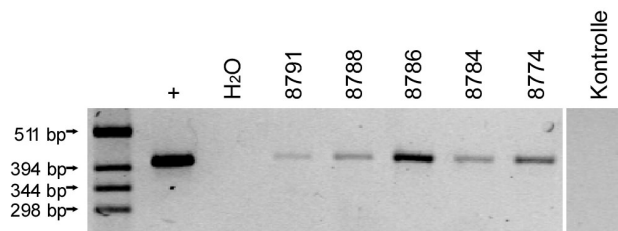


Abbildung 55. RT-PCR zum qualitativen Nachweis eGFP-spezifischer Transkripte. +, Positivkontrolle. Wasser und eine Wildtyp-Kontrolle sind negativ.

Als nächstes sollte die Transgen-Expression der F1-Tiere mit den ursprünglichen Foundern verglichen werden. Dazu wurde das Ergebnis der Western Blots (Abbildung 54) mittels eines rekombinanten eGFP-Standards quantifiziert (Abbildung 56). Die Summe der eGFP-Expression aller Einzel-Integranten in der F1-Generation ergab etwa den Expressions-Level des Founders (Abbildung 56, z.B. 8514 = c+d+e). Dies weist darauf hin, daß die Expression lentiviraler Transgene durch Weitergabe an die nächste Generation nicht verändert oder abgeschaltet werden.

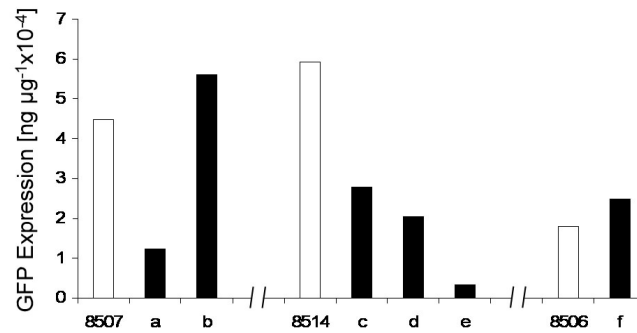


Abbildung 56. Statistische Auswertung der eGFP-Expression. Gezeigt sind die Expressions-Level der individuellen Integranten (F1-Generation) und der drei Founder-Tiere (#8507, #8514 und #8506).

8.3.2. Analyse der integrierten Proviren

Frühere Studien hatten signifikante Deletionen einiger retroviraler Integranten in transgenen Mäusen gezeigt (Jahner and Jaenisch, 1980). Um zu untersuchen, ob Deletionen innerhalb der Integranten *a* und *e* für deren geringe Expression verantwortlich sind, wurde genomische DNA aller Tiere mit *Sst*I geschnitten. *Sst*I schneidet je 2 mal in den proviralen LTRs und erzeugt so ein 3,4 kb-Fragment, wenn das Provirus intakt ist (Abbildung 57). In allen untersuchten Tieren wurde die besagte Bande vorgefunden. Daher konnten größere Deletionen innerhalb des Provirus ausgeschlossen werden.

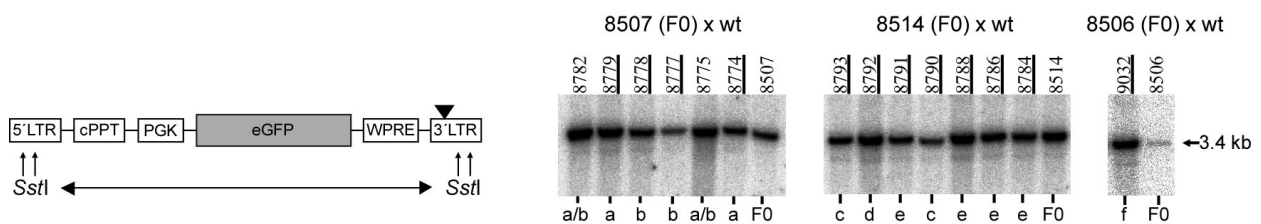


Abbildung 57. Nachweis der proviralen Integrität mittels Southern Blot. *Sst*I schneidet je 2 mal in den LTRs und generiert ein 3,4 kb-Fragment wenn das Provirus intakt ist.

Mit der Southern Blot Analyse können jedoch kleinere Deletionen (< 0,5 kb) nicht detektiert werden. Zur genaueren Untersuchung wurden deshalb PCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde das LV-PGK Provirus in 5 Abschnitte (0,6 bis 1 kb) unterteilt und mit den entsprechenden Primer-Paaren amplifiziert (Abbildung 58). Es zeigten sich für alle untersuchten Integranten die korrekten PCR-Amplikons. Auf diese Weise konnte die Intaktheit der lentiviralen Integranten nachgewiesen werden. (Abbildung 58).

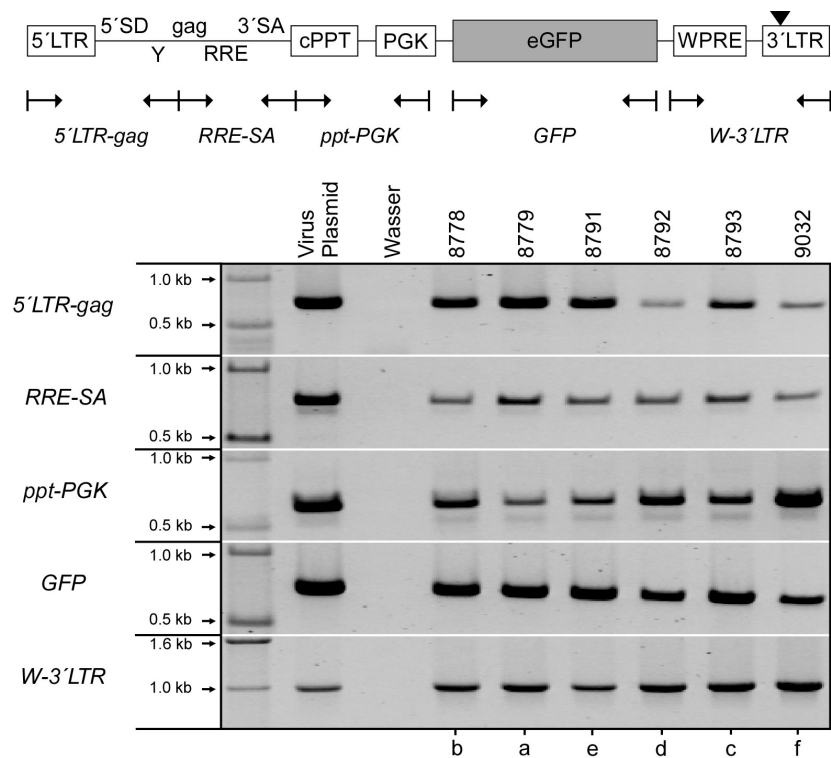


Abbildung 58. Nachweis der Intaktheit der Proviren. PCR-Analysen der Integranten *a - f* mit verschiedenen Primer-Paaren.

8.3.3. Untersuchung der epigenetischen Regulation

Da Deletionen oder Reorganisationen der Proviren als Ursache für die verminderte Expression einiger Integranten ausgeschlossen werden konnte, sollte nun die epigenetische Regulation untersucht werden. Die Expression retroviraler Gene wird durch *de-novo* Methylierung supprimiert (Jahner *et al.*, 1982; Pannell *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2004). Bei der *de-novo* Methylierung wird am Cytosin von CpG-Dinukleotiden eine Methylgruppe angehängt (Cooper, 1983). Nun stellte sich die Frage, ob auch lentivirale Vektoren methyliert werden. Dies wurde zunächst durch Methylierungs-sensitive Southern Blot Analyse untersucht. Dabei wird genomische DNA mit Methylierungs-sensitiven Restriktions-Enzymen verdaut (Abbildung 59).

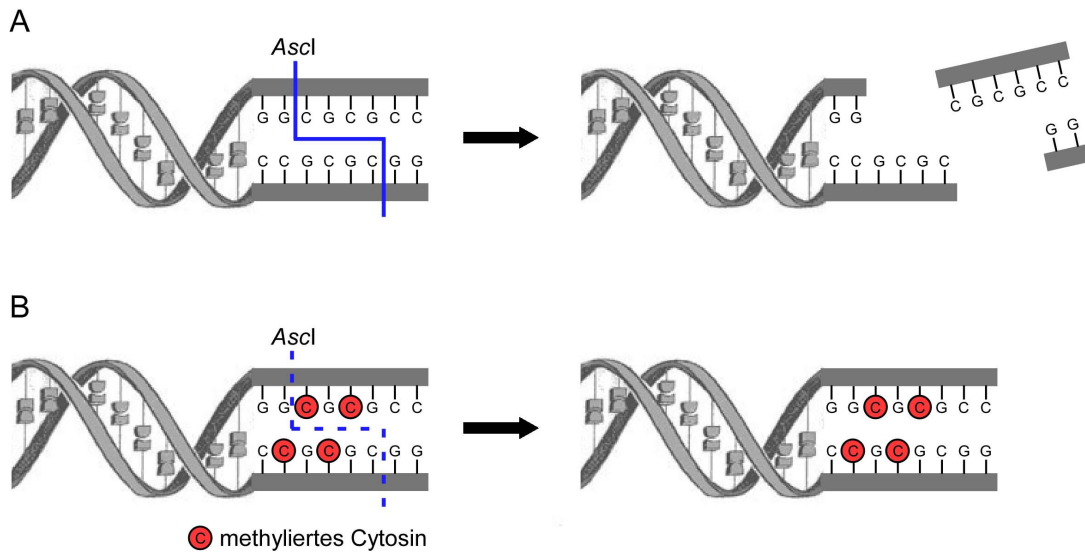


Abbildung 59. Schematische Darstellung der DNA-Restriktion von *AscI* im Falle von unmethylierter (A) und methylierter DNA (B).

Der PGK-Promoter des verwendeten Lentivektors hat eine Länge von 594 Basen und beinhaltet insgesamt 66 CpGs (~11 CpGs/100 Basen) (Singer-Sam *et al.*, 1983). Mit dem Restriktions-Enzym *AscI* (Restriktions-Sequenz GG/CGCGCC) sollte zunächst der Methylierungs-Status von zwei dieser CpGs untersucht werden (Abbildung 60A). Hierzu wurde folgende Strategie verwendet: Ein Verdau genomischer DNA mit *AscI* in Kombination mit *EcoRI* führt bei unmethylierter *AscI*-Schnittstelle zu 2 Fragmenten (0,3 und 1,5 kb) (Abbildung 60A). Ist dagegen *AscI* methyliert, so zerfallen die Fragmente nicht und der *AscI/EcoRI*-Verdau ergibt eine 1,8 kb Bande (Abbildung 60A).

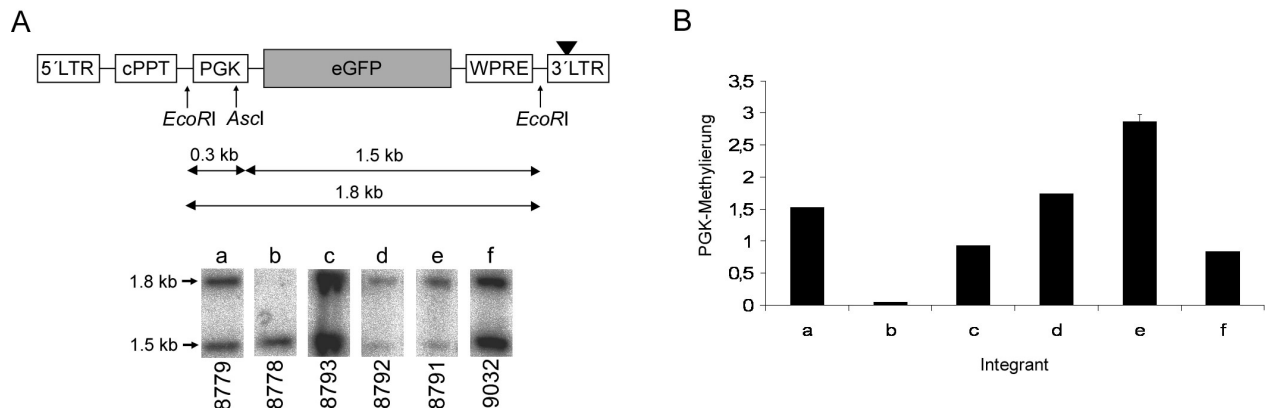


Abbildung 60. Southern Blot Analyse zur Untersuchung der Promoter-Methylierung. (A) Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *AscI* resultiert in einer 1,5 kb Bande, wenn die genomische DNA nicht methyliert ist, während Methylierung zu einer 1,8 kb Bande führt. (B) Methylierungs-Grad der Integranten a - f. Koeffizienten der methylierten (1,8 kb) geteilt durch die nicht-methylierten (1,5 kb) Bande.

Beide Banden (1,8 kb versus 1,5 kb) konnten nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente zueinander in Relation gesetzt werden. Der Quotient von methylierter versus unmethylierter Bande (1,8 kb/1,5 kb) spiegelte den Methylierungs-Grad wider und variierte zwischen 0,05 (Integrand *b*, hohe Expression) und 2,9 (Integrand *e*, niedrige Expression) (Abbildung 60B).

Die für eGFP kodierende Sequenz (748 bp) beinhaltet 63 CpGs (~8 CpGs/100 Basen). Zur Untersuchung der eGFP-Methylierung wurde das Methylierungs-sensitive Restriktionsenzym *HpaII* verwendet. *HpaII* schneidet - wie sein *nicht* Methylierungs-sensitives Isoschizomer *MspI* - insgesamt fünf mal innerhalb der eGFP-Sequenz (Restriktions-Sequenz C/CGG, Abbildung 61A). Im Schema sind die vier möglichen eGFP-Fragmente dargestellt (Abbildung 61A, gestrichelte Linien). Das kleinste Fragment (0,5 kb) entsteht, wenn die Restriktion von *HpaII* nicht durch Methylierung gehemmt wird. Ist eine oder mehrere der *HpaII*-Schnittstellen jedoch durch Methylierung blockiert, so entstehen Fragmente die größer sind als 0,5 kb (Abbildung 61A). Zum direkten Vergleich wurden alle DNA-Proben auch mit *MspI* geschnitten. *MspI* ist nicht sensitiv gegenüber Methylierung und zeigt daher das gleiche Restriktionsmuster wie *HpaII* bei komplett unmethylierter DNA (Abbildung 61A). *HpaII*- und *MspI*-verdaute Proben wurden nebeneinander aufgetragen (Abbildung 61A). Der Methylierungsgrad wurde durch den Quotienten (M-H)/H berechnet (M=*MspI* Banden-Intensität, H=*HpaII* Banden-Intensität). Er variierte zwischen 0,01 (keine signifikante DNA-Methylierung, Integrand *b*) bis zu 0,92 (höchster Grad von Methylierung, Integrand *a*) (Abbildung 61B).

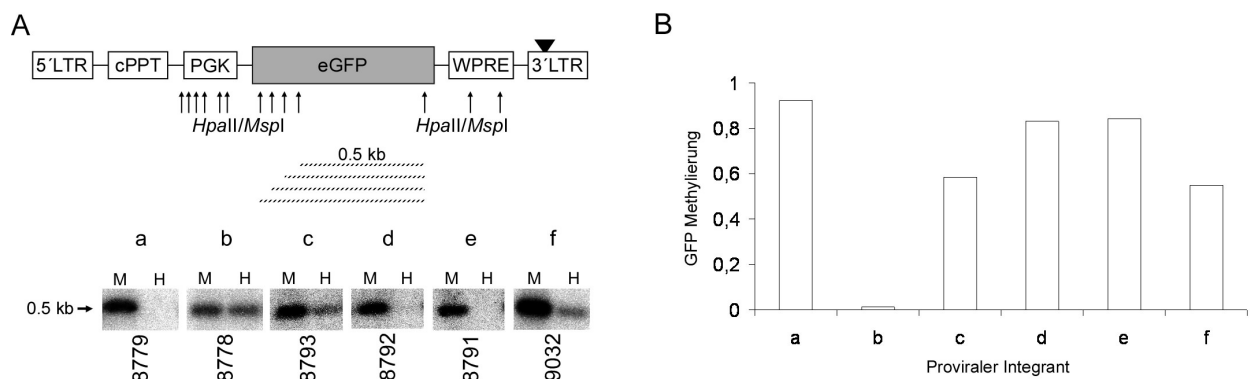


Abbildung 61. Methylierungs-sensitiver Southern Blot zur Untersuchung von eGFP. (A) *HpaII* und *MspI* schneiden insgesamt fünf mal innerhalb der eGFP-Sequenz. Gestrichelte Linien zeigen die möglichen DNA-Fragmente (oben). Genomische DNA wurde mit beiden Enzymen verdaut und nebeneinander aufgetrennt (unten). Die Integranten *a-f* zeigen je nach Methylierungsgrad eine 0,5 kb-Bande beim *HpaII*-Verdau. (B) Der Methylierungsgrad wurde durch den Quotienten (M-H)/H berechnet (M=*MspI* Banden-Intensität, H=*HpaII* Banden-Intensität).

Bei allen untersuchten Integranten wurde nur die 0,5 kb Bande beobachtet und keine der anderen möglichen eGFP-Fragmente (gestrichelte Linien in Abbildung 61). Dies deutet darauf hin, daß nicht nur einzelne CpGs methyliert werden, sondern daß es offenbar zu einer globalen Methylierung kommt.

Southern Blot Analysen mit weiteren Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen bestätigten die bisherigen Ergebnisse. *EagI* hat 2 Restriktions-Stellen (C/GGCCG) innerhalb des Provirus, eine im Promoter und eine am 3'-Ende des Transgens (Abbildung 62). *EcoRI* schneidet ebenfalls 2 mal im Provirus und erzeugt ein 1,9 kb Basis-Fragment, welches beide *EagI*-Schnittstellen beinhaltet (Abbildung 62). Durch die Kombination von *EagI* mit *EcoRI* zerfällt das 1,9 kb-Fragment, je nach Methylierungsgrad der beiden *EagI*-Schnittstellen, in 0,9 kb und weitere Fragmente (Abbildung 62). Der Integrant *b* (nicht methyliert) zeigte nur die 0,9 kb Bande (Abbildung 62). Bei allen anderen Integranten waren die *EagI*-Schnittstelle partiell methyliert (1,5 kb und 1,9 kb Banden). Auch bei dieser Untersuchung zeigten die Integranten *a* und *e* den höchsten Methylierungsgrad (keine 0,9 kb Bande; 1,5 kb Bande schwach; 1,9 kb Bande am stärksten).

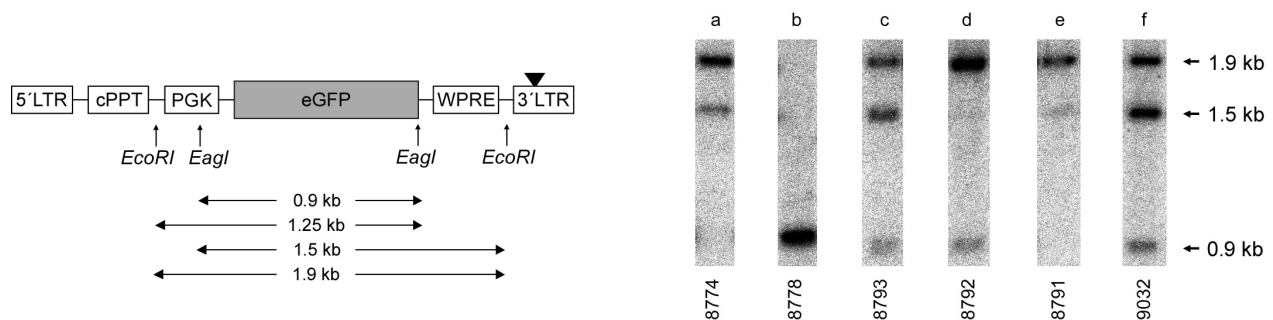


Abbildung 62. Southern Blot Analyse mit dem Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym *EagI*. Je nach Methylierungsgrad der beiden *EagI*-Schnittstellen können vier Fragmente entstehen. Die Integranten *a-f* zeigen unterschiedliche Bandenmuster.

Es stellte sich die Frage, ob der Grad der Methylierung mit der Transgen-Expression korreliert. Die Expression wurde mittels Western Blot quantifiziert (Abbildung 54), der Methylierungs-Grad durch Southern Blot ermittelt (Abbildung 60 und Abbildung 61). Die stark methylierten Integranten (*a* und *e*) zeigten die niedrigste eGFP-Expression (Abbildung 63A). Sowohl für den Promoter, wie auch für das Transgen, ergab sich eine negative lineare Korrelation zwischen Transgen-Expression und Methylierungs-Grad (Abbildung 63B). Mit steigender Methylierung nahm die Transgen-Expression ab (Abbildung 63B).

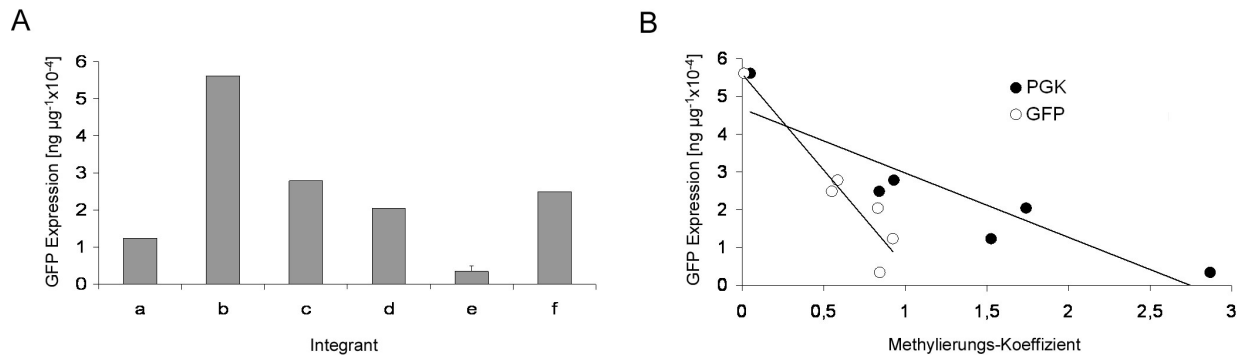


Abbildung 63. Statistische Auswertung der eGFP-Expression und Korrelation mit dem Methylierungs-Grad. (A) Expressionslevel der untersuchten Integranden. (B) Lineare Korrelation zwischen eGFP-Expression und Grad der DNA-Methylierung für Promoter (PGK) und Transgen (eGFP).

8.3.4. Untersuchung der proviralen Methylierung mittels Bisulfit-Sequenzierung

Da mittels Southern Blot nur eine geringe Zahl von CpG-Dinukleotiden untersucht werden konnte, wurde der Methylierungsstatus der verschiedenen Integranden durch Bisulfit Sequenzierung untersucht. Die Bisulfit-Methode beruht darauf, daß durch die Behandlung genomischer DNA mit Natriumbisulfit spezifisch diejenigen Cytosine in Uracile umgewandelt werden, die keinen Methyl-Rest tragen (Abbildung 64) (Frommer *et al.*, 1992).

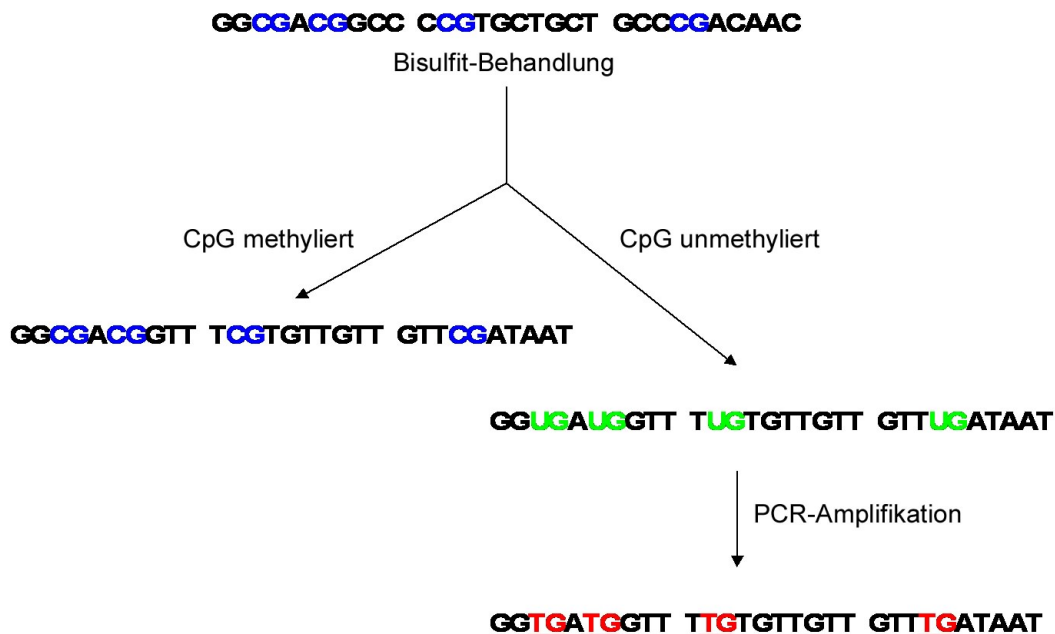


Abbildung 64. Schematische Darstellung der Bisulfit-Sequenzierung. Je nach Methylierungs-Status der einzelnen CGs werden diese durch die Behandlung mit Natriumbisulfit in TGs umgewandelt und können somit durch Sequenzierung bestimmt werden.

Dazu wurde im Promoter eine 234 bp-Sequenz mit insgesamt 24 CpGs untersucht (Abbildung 65). Zwei dieser 24 CpGs lagen in der *AscI*-Schnittstelle, die bereits mit Southern Blot untersucht wurde (Abbildung 65A, siehe auch Abbildung 60). Im Integranten *b* (Tier #8778) wurden keine methylierten CpGs (mCpGs) gefunden ($n=6$, Abbildung 65A). Im Gegensatz dazu waren im Integrant *a* (Tier #8779, geringe eGFP-Expression) 87.5% der CpGs methyliert (21 ± 1.4 ; $n=8$, \pm SEM) (Abbildung 65A). Das am geringsten exprimierende Provirus (Integrand *e*, Tier #8791) zeigte mit 23 ± 0.5 mCpGs auch den höchsten Grad an Methylierung (95%, Abbildung 65A). Anschließend wurde das Methylierungsprofil des eGFP-Reporters untersucht (Abbildung 65B). Dazu wurde eine 255 bp-Sequenz mit 18 CpGs untersucht. Diese liegt innerhalb des 0,5 kb *HpaII/MspI*-Fragments (Abbildung 65B, siehe auch Abbildung 61). Integrant *b* (Tier #8778) zeigte mit 1.9% (0.3 ± 0.2 ; $n=6$) mCpGs (Abbildung 65B) nur minimale Methylierung. Dagegen war die eGFP-Sequenz in den Integranten *a* (Tier #8779) und *e* (Tier #8791) mit 94% (17 ± 0.5 ; $n=8$) und 97% (17.5 ± 0.2 ; $n=8$) mCpGs fast komplett methyliert (Abbildung 65B).

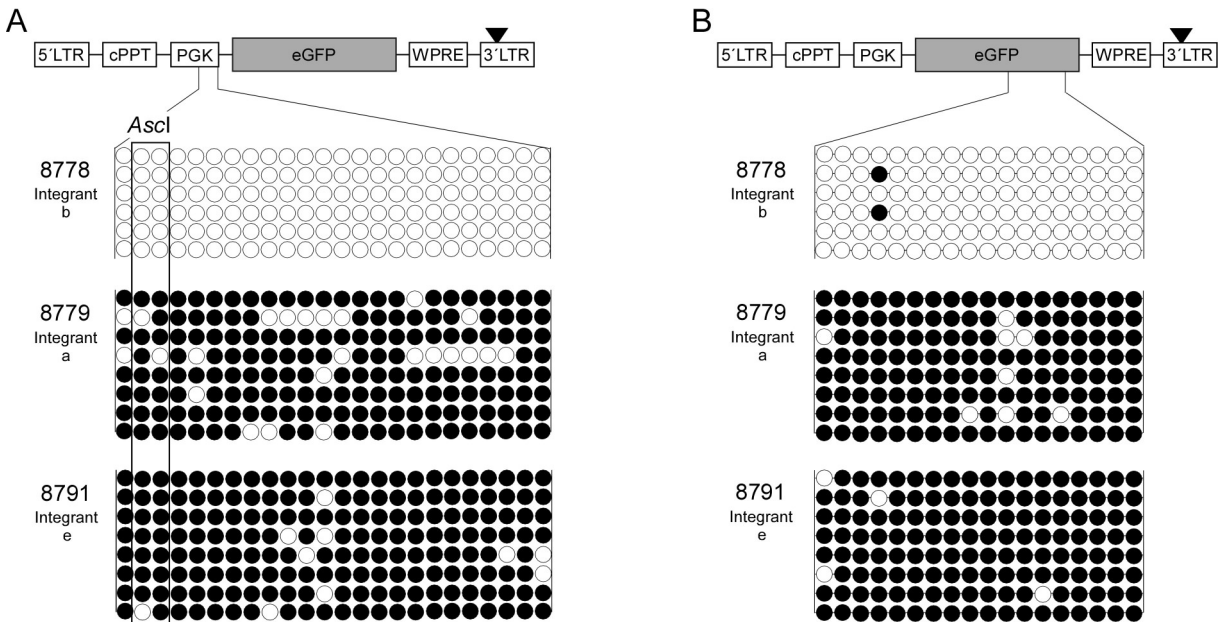


Abbildung 65. Bisulfit Sequenzierung des Promoters und des Transgens. Es wurde bei den Integranten *b* (Tier #8778), *a* (Tier #8779) und *e* (Tier #8791) ein 234 bp-Fragment mit 24 CpGs im Promoter (A) und ein 255 bp-Fragment mit insgesamt 18 CpGs im Transgen (B) auf Methylierung untersucht. Die beiden CpGs der *AscI*-Schnittstelle im PGK-Promoter sind eingezeichnet. Schwarze Kreise stehen für methylierte, weiße Kreise für nicht-methylierte CpGs.

8.3.5. Effekte von 5-AzaC und TSA auf die Transgen-Expression

Um den Einfluß proviraler Methylierung auf die zelluläre Transgen-Expression zu untersuchen, wurden Haut-Fibroblasten der transgenen Schweine #8779 (Integrand *a*) und #8778 (Integrand *b*) isoliert. Zur Untersuchung wurden diese so wie in Abbildung 66 dargestellt inkubiert.

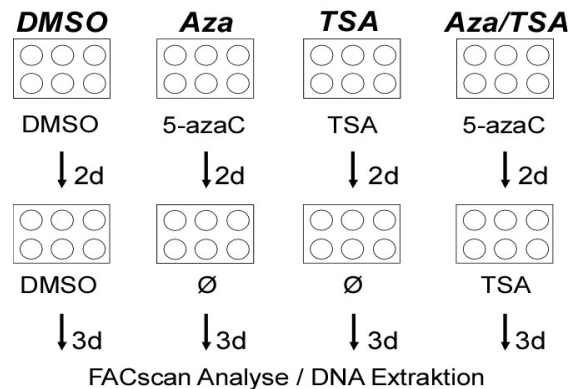


Abbildung 66. Inkubationsschema für die Untersuchung von Schweine-Fibroblasten nach 4 verschiedenen Versuchsbedingungen: DMSO, Aza, TSA und konsekutiv Aza/TSA.

Die Zellen wurden zunächst für zwei Tage mit dem potenten DNA-Methylase Inhibitor 5-Azacytidin (Aza), dem Histon-Deacetylase Inhibitor Trichostatin A (TSA) oder als Kontrolle mit DMSO kultiviert (Abbildung 66). Anschließend wurden die Fibroblasten für drei weitere Tage mit TSA (Aza/TSA), DMSO (DMSO) oder in Medium (Ø) inkubiert (Abbildung 66). Die Inkubation der Fibroblasten von Tier #8779 (stark methylierter Integrand *a*) mit 5-AzaC führte zu einem Anstieg der eGFP-Fluoreszenz um 180% (Abbildung 67).

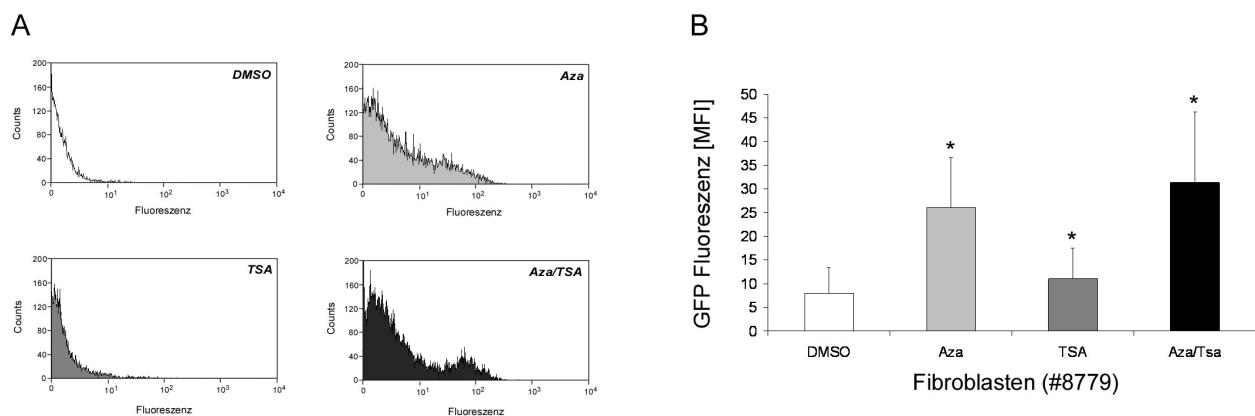


Abbildung 67. Effekt von 5-AzaC und TSA auf die zelluläre eGFP-Expression. (A) Fibroblasten des methylierten Integranten *a* (#8779) zeigten nach Inkubation mit 5-AzaC in der FACScan Analyse einen signifikanten Fluoreszenz-Anstieg. (B) Statistische Auswertung der Fluoreszenz-Intensität von 7 unabhängigen Versuchen (n=7), *p<0,05 bezogen auf DMSO.

Die Inkubation mit TSA dagegen steigerte die Transgen-Expression nur um 22% (Abbildung 67). Beide Inhibitoren zusammen erhöhten die eGFP-Fluoreszenz insgesamt um 230% (Abbildung 67). Interessanterweise zeigten die Zellen des Tieres #8778 (nicht-methylierter Integrant *b*) unter gleichen Versuchsbedingungen keine Änderung der eGFP-Fluoreszenz.

Abschließend wurde noch der Effekt von 5-AzaC und TSA auf den Grad der DNA-Methylierung der behandelten Zellen untersucht. Hierzu wurde erneut eine Southern Blot Analyse mit dem Methylierungs-sensitiven Enzym *AscI* durchgeführt (Abbildung 68A, siehe auch Abbildung 60) und der Grad der Methylierung durch den Quotienten von methylierter (1,8 kb) zu unmethylierter (1,5 kb) Bande bestimmt (Abbildung 68B). Die mit 5-AzaC behandelten Zellen zeigten eine 45%ige Reduktion der Methylierungsdichte im Vergleich zu Kontroll-Zellen (Abbildung 68). Wie erwartet wurde der Grad der Methylierung durch TSA nicht beeinflusst (Abbildung 68).

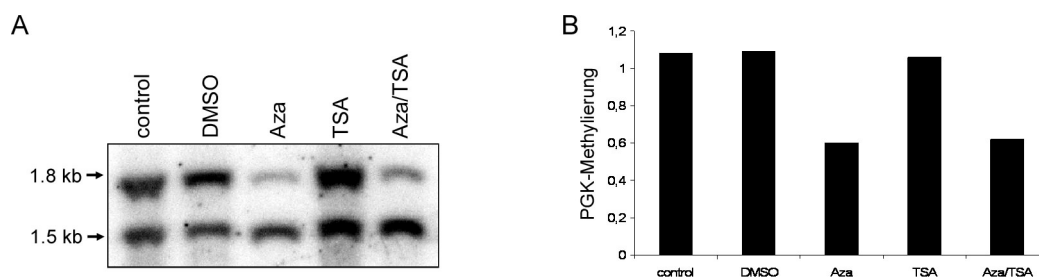


Abbildung 68. Einfluß von 5-AzaC auf den Methylierungsgrad von Fibroblasten, isoliert aus einem schwach exprimierenden Schwein (8779, Integrant *a*). (A) Methylierungs-sensitiver Southern Blot (*EcoRI/AscI*-Verdau) zur Untersuchung der Promoter-Methylierung nach Inkubation mit DMSO, 5-AzaC, TSA und 5-AzaC/TSA. (B) Durch die Behandlung mit 5-AzaC wurde der Grad der DNA-Methylierung signifikant erniedrigt, während TSA- und DMSO-Inkubation keinen Einfluß hatten.

Es konnte somit gezeigt werden, daß durch Hemmung zellulärer Methylasen die gesilencete Transgen-Expression eines stark methylierten Provirus wieder reaktiviert werden konnte. Die Behandlung der gleichen Zellen mit TSA hatte nur einen marginalen Effekt auf die eGFP-Expression. Die Expression lentiviraler Vektoren kann also signifikant durch DNA-Methylierung beeinflusst werden.

9. Diskussion

9.1. Lentivirale Transgenese

Lentivirale Vektoren wurden aus verschiedenen human- oder tierpathogenen Lentiviren, wie zum Beispiel HIV-1, entwickelt (Review in (Pfeifer and Verma, 2001)) und sind ein vielseitig einsetzbares Werkzeug für den Gentransfer (Kafri *et al.*, 2000). Sie sind in der Lage die Kernmembran zu überwinden und können somit das Wirts-Chromosom in jeder Phase des Zell-Zyklus erreichen um ihr virales Genom zu integrieren (Naldini *et al.*, 1996). Diese Eigenschaft befähigt sie auch terminal differenzierte Zellen, wie zum Beispiel nicht-teilende T-Lymphozyten zu transduzieren (Barry *et al.*, 2000). Durch die Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren mit *VSV.G* konnte der Tropismus im Vergleich zu den ursprünglichen Viren stark ausgeweitet werden. Der Viruseintritt in die Zelle verläuft mit dem *VSV.G*-Hüllenprotein nicht mehr über spezifische Rezeptoren, sondern über Bindung an Phospholipide der Zellmembran (Spector *et al.*, 1990). Mit Hilfe solcher lentiviraler Vektoren ist es möglich effizient Gehirn, Leber, Muskeln und Retina von Mäusen *in vivo* zu transduzieren, ohne daß eine Immunantwort des Wirtes stimuliert wurde (Blomer *et al.*, 1997; Kafri *et al.*, 1997; Miyoshi *et al.*, 1997; Naldini *et al.*, 1996).

Obwohl mit Hilfe lentiviraler Vektoren transgene Nagetiere (Mäuse und Ratten) erzeugt werden konnten (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002), war lentiviraler Gentransfer in höheren Säugetieren bisher noch nicht erfolgreich. Eine Studie in Affen zeigte nach Infektion von Präimplantationsembryonen lediglich die Transduktion der extraembryonalen Gewebe (Plazenta). Es konnten jedoch keine transgenen Affen erzeugt werden (Wolfgang *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob lentivirale Transgenese überhaupt auf höhere Säugetiere anwendbar ist.

Bei der Erzeugung transgener Mäuse mit dem klassischen Verfahren (DNA-MI) kann die relativ geringe Effizienz (2,6% transgene Tiere bezogen auf die Anzahl der manipulierten Embryonen; Review in (Wall, 1996)) durch Verwendung großer Anzahlen an Embryonen und die kurzen Generationszeiten der Tiere kompensiert werden (Fassler, 2004). In höheren Säugetieren (z.B. Schweinen) ist die Effizienz der DNA-MI jedoch noch geringer (< 1%; Review in (Wall, 1996)). Außerdem ist bei größeren Säugetieren sowohl die Gewinnung von Embryonen wie auch die Haltung der Tiere selbst zeitaufwendig und kostspielig. Die Kombination aus geringer Effizienz, langen Generationszeiten und hohen Haltungs-Kosten macht die DNA-MI damit

äußerst unwirtschaftlich für die Erzeugung transgener Nutztiere (Moffat, 1998; Wells *et al.*, 1999). Andererseits wären transgene Nutztiere von großer biomedizinischer Bedeutung. Das Spektrum reicht vom "gene farming", also der Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine, bis hin zur Xenotransplantation (Organtransplantation vom Tier zum Menschen).

9.2. Verwendetes Vektor-Konstrukt

Für die Erzeugung transgener Schweine und Rinder wurden zunächst lentivirale Vektoren verwendet, die eine ubiquitäre Expression des Transgens erlauben (LV-PGK): (i) Wegen seiner starken und ubiquitären Transgen-Expression im Maus-Modell (Zernicka-Goetz *et al.*, 1997) wurde der PGK-Promoter gewählt. Zur Untersuchung der Gewebe-spezifischen Transgen-Expression im Schwein wurde der PGK-Promoter des LV-PGK Vektors durch den K14-Promoter (Munz *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1989) ersetzt (LV-K14). (ii) Die Verwendung des eGFP-Reportergens erlaubt den Nachweis der Transgen-Expression mittels *in vivo*-Imaging. Damit steht ein Verfahren zur Verfügung, mit dem die Anwesenheit des Transgens schnell und nicht-invasiv nachgewiesen werden kann. (iii) Ein weiterer Aspekt für die praktische Anwendbarkeit eines transgenen Verfahrens ist die optimale Expression des Transgens. Um möglichst hohe Expressionen zu erreichen, wurden 2 Verstärker-Elemente in das Vektor-Konstrukt inkorporiert: cPPT und WPRE (Follenzi *et al.*, 2000; Zufferey *et al.*, 1999). (iv) Die U3-Region der 3'-LTRs wurde fast vollständig entfernt (SIN-Vektoren), sodaß das integrierte Provirus keine der ursprünglichen viralen Verstärker- und Promoter-Sequenzen mehr trug (Miyoshi *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1998). (v) Durch die Pseudotypisierung mit *VSV.G* (Akkina *et al.*, 1996; Naldini *et al.*, 1996) wurde die Stabilität der infektiösen Partikel erhöht, damit ausreichend hohe Virus-Titer für die Erzeugung transgener Nutztiere erreicht werden konnten.

9.3. Lentivirale Infektion von Schweine- und Rinder-Embryonen

Um ein genotypisch homogenes Tier mit geringem Mosaicismus zu erzeugen, ist es wichtig, daß die virale Infektion zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der embryonalen Entwicklung stattfindet. Die lentivirale Infektion von Zygoten führte zur Geburt transgener Mäuse, die Transgen-Expression in allen Organen zeigten (Lois *et al.*, 2002). Auch durch Infektion von 8 bis 16-zelligen Morulae konnten transgene Mäuse erzeugt werden (Pfeifer *et al.*, 2002). Diese

zeigten ebenfalls in allen Organen Expression des Transgens, trotzdem variierte die Intensität der Expression, zum Beispiel in der Haut, deutlich (Pfeifer *et al.*, 2002).

Zur Erzeugung transgener Schweine wurden daher ein- bis zweizellige Zygoten für die lentivirale Infektion verwendet. Für den Embryo ist die subzonale Injektion von Virus-Lösung nur minimal invasiv. Mit einer Glaskapillare wird die Zona Pelluzida überwunden und das Virus in den perivitellinen Raum appliziert. Auf diese Weise war der Embryo nur geringfügig beeinträchtigt und die embryonalen Entwicklungs-Raten waren doppelt so hoch wie bei der DNA-MI (Statistik zur DNA-MI aus (Wall, 1996)). Eine Alternative zur subzonalen Injektion ist die Entfernung der Zona Pelluzida (Zonolysis) durch chemische Verfahren (z.B. Behandlung mit Tyrode-Lösung). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich zur Erzeugung lentiviral transgener Mäuse verwendet (siehe Tabelle 7) (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Die Anwendung dieser Methode auf Schweine-Embryonen scheiterte jedoch, da das Entfernen der Zona Pelluzida durch Tyrode-Lösung für die Embryonen fatal war.

Insgesamt wurden 244 Schweine-Zygoten mit LV-PGK durch subzonale Injektion infiziert und endoskopisch in 6 Empfänger transferiert. Southern Blot Analysen identifizierten 32 der 46 geborenen Tiere (70%) als transgen mit einer durchschnittlichen Integrantenzahl von $4,6 \pm 0,9$ (Tabelle 7). Davon zeigten 30 Tiere eGFP-Expression (94%). Alle untersuchten Organe (Derivate der drei Keimblätter) zeigten grüne Fluoreszenz, ebenso die extraembryonalen Gewebe (Plazenta und Nabelschnur). Diese hohe Transgenese-Rate stellt eine circa 27fache Steigerung der Effizienz im Vergleich zur DNA-MI dar (Statistik zur DNA-MI aus (Wall, 1996)). Damit konnte in dieser Arbeit ein effizientes Verfahren zur Erzeugung transgener Schweine etabliert werden.

Analog zur Vorgehensweise bei Schweinen wurden zur Erzeugung transgener Rinder Zygoten subzonal mit LV-PGK injiziert. Die infizierten Embryonen wurden *in vitro* bis zum Blastozysten-Stadium (Tag 7) kultiviert. Überraschenderweise zeigte sich, daß die aus transduzierten Zygoten stammenden Blastozysten nur schwache fluoreszierten. Außerdem führte der Transfer von 17 dieser Blastozysten in 10 Empfänger lediglich zur Geburt von nicht-transgenen Kälbern.

Eine Studie mit prototypischen Retroviren hatte bereits gezeigt, daß durch Infektion von Oozyten mit MuLV höhere Transduktionsraten erreicht werden konnten als bei Zygoten (Chan *et al.*, 1998). Oozyten befinden sich vor ihrer Befruchtung (während der zweiten Meiose) in einen Metaphase II-Arrest, in dem die Kernmembran aufgelöst ist. Obwohl Lentiviren nicht-teilende Zellen infizieren können (Naldini *et al.*, 1996) lag die Vermutung nahe, daß auch die Integration

der lentiviralen DNA in das Wirts-Chromosom durch den Wegfall der Kernmembran erleichtert werden könnte (Chan *et al.*, 1998). Deshalb wurde die Strategie geändert und zur Infektion von Oozyten gewechselt. Tatsächlich war die eGFP-Fluoreszenz in den aus Oozyten stammenden Blastozysten um ein Vielfaches intensiver. Insgesamt exprimierten 83% dieser Blastozysten das Reportergen. Nach dem Transfer von 8 eGFP-positiven Blastozysten in vier Empfänger wurden vier Kälber geboren. Alle Kälber waren transgen und exprimierten eGFP. Eine derart hohe Effizienz konnte bisher mit keinem anderen Gentransfer-Verfahren für die Spezies Rind gezeigt werden.

Es stellt sich jedoch die Frage, wieso die aus Zygoten-Infektion stammenden Blastozysten fluoreszierten und dennoch keine transgenen Tiere auf diesem Weg erzeugt werden konnten. Offenbar kam es nach der subzonalen Injektion der Zygoten nicht zu einer Integration der lentiviralen Vektoren. Die beobachtete Fluoreszenz könnte von nicht-integrierten Proviren stammen. Die Expression von nicht-integrierten Lentiviren wurde kürzlich von zwei Arbeitsgruppen veröffentlicht (Galla *et al.*, 2004; Yanez-Munoz *et al.*, 2006). Allerdings werden diese nicht-integrierten Proviren bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben und gehen damit während der frühen Embryogenese quasi "verloren". Eine weitere mögliche Erklärung könnte der "carryover" von eGFP Protein aus den 293T-Verpackungszellen durch die viralen Partikel sein. Dieser auch als Pseudo-Transduktion bezeichnete Mechanismus könnte ebenfalls eine schwache und nur kurz nach der Infektion detektierbare grüne Fluoreszenz bewirken (Goujon *et al.*, 2003).

9.4. Epigenetische Regulation lentiviraler Vektoren

Die Expression retroviraler Gene wird durch *de-novo* Methylierung von CpG-Nukleotiden und Histon-Deacetylierung beeinflusst. Bisherige Studien zu lentiviral transgenen Mäusen (Tabelle 7) hatten aufgrund der hohen Effizienzen postuliert, daß lentivirale Vektoren nicht dem klassischen Silencing unterliegen (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Allerdings basierten diese Studien auf transgenen Foundern (F0-Generation) mit mehreren Integranten (Tabelle 7), sodaß Silencing eines Bruchteils der lentiviralen Integranten möglicherweise nicht erkannt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß lentivirale Vektoren *in vivo* epigenetischen Regulations-Mechanismen unterliegen.

Tabelle 7. Statistische Darstellung der Effizienz des lentiviralen Gentransfers in Mäusen, Schweinen und Rindern. SI, subzonale Injektion von Virus-Suspension; D, Denudieren der Embryonen und Koinkubation mit Virus.

	Infektions-Methode	Infizierte Embryonen	Tiere			Lentivirale Integranten	
			geboren	transgen	eGFP ⁺	Durchschnitt	max. Anzahl
Mäuse	SI	270 ^a	73 ^a	63 ^a	58 ^a	8,4 ^a	21 ^a
Mäuse	D	265 ^a	31 ^a	19 ^a	18 ^a	4 ^a	12 ^a
Schweine	SI	244	46	32	30	4,6	20
Schweine	SI	120 ^b	40 ^b	37 ^b	35 ^b	kA	5 ^b
Rinder	SI	8	4	4	4	9,2	15

^aDaten aus (Lois *et al.*, 2002). ^bDaten aus (Whitelaw *et al.*, 2004). kA, keine Angabe.

Aus diesem Grund wurden Founder-Schweine verpaart, um transgene Tiere (F1-Generation) mit einzelnen Integranten zu erzeugen. Western Blot Analysen offenbarten bei etwa 1/3 der untersuchten Proviren nur schwache bzw. gar keine Expression. Die Untersuchung dieser Proviren mittels Methylierungs-sensitiven Southern Blots und Bisulfit-Sequenzierung zeigte methylierte CpG-Dinukleotide innerhalb der viralen Sequenzen. Der Grad der proviralen Methylierung korrelierte dabei negativ mit der Transgen-Expression. Um den Einfluß der Methylierung auf die Expression zu untersuchen, wurden von einem nicht-exprimierenden Schwein Haut-Fibroblasten isoliert und mit dem Methylase-Inhibitor 5-AzaC inkubiert. Dadurch konnte die abgeschaltete eGFP-Expression wieder teilweise reaktiviert werden.

In einer früheren Studie wurde postuliert, daß die transkriptionelle Inaktivierung von lentiviralen Vektoren unabhängig von DNA-Methylierung abläuft und primär von Histon-Deacetylierung bestimmt wird (Pannell *et al.*, 2000). Außerdem wurde gezeigt, daß abgeschaltete lentivirale Transgene in ES-Zellen durch repressives Chromatin (Heterochromatin), bestehend aus hypoacetylierten Histonen H3 und H1, gekennzeichnet sind (Yao *et al.*, 2004). Leider wurde der Methylierungs-Status der lentiviralen Integranten nicht bestimmt (Yao *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß Cytosin-Methylierung ein wichtiger Regulations-Mechanismus der lentiviralen Expression in transgenen Schweinen ist. Obwohl eine Beteiligung von Chromatin-Modifikationen bei der epigenetischen Manifestation des Silencings nicht ausgeschlossen werden kann, scheinen TSA-abhängige HDACs jedoch keine wesentliche Rolle zu spielen. Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede wäre, daß sich die epigenetische Regulation lentiviraler Vektoren in ES-Zellen der Maus und während der Embryogenese (im

Uterus) unterscheidet. Außerdem ist nicht auszuschließen, daß in verschiedenen Spezies unterschiedliche epigenetische Mechanismen vorherrschen.

Wie bereits dargestellt, spielt *de-novo* Methylierung auch beim Silencing prototypischer Retroviren eine wichtige Rolle. Allerdings scheint die Häufigkeit des Silencings bei lentiviralen und retroviralen Vektoren unterschiedlich zu sein. Während nur ein Bruchteil der lentiviralen Integranen *in vivo* schwach exprimierte, wurde die Expression der MuLV-Proviren in Mäusen und Rindern während der Differenzierung fast vollständig abgeschaltet (Chan *et al.*, 1998; Jahner *et al.*, 1982). Eine Studie mit murinen ES-Zellen, in der die Transkription lentiviraler und retroviraler Vektoren direkt miteinander verglichen wurde (Hamaguchi *et al.*, 2000), zeigte ähnliche Resultate. Die lentiviralen Proviren exprimiert auch während und nach der Differenzierung der Zellen nahezu konstant, die Expression der MuLV-Proviren jedoch wurde stark reduziert (Hamaguchi *et al.*, 2000). Allerdings wurden in dieser Studie Vektoren mit Wildtyp-LTRs (nicht-SIN) verwendet (Hamaguchi *et al.*, 2000). Die verschiedenen Anfälligkeiten der Vektoren gegenüber epigenetischen Regulations-Mechanismen könnten auf Unterschiede der Biologie der Ursprungsviren und des Vektor-Designs begründet sein. MuLV und HIV zeigen unterschiedliche Präferenzen für den Integrations-Ort (Schroder *et al.*, 2002; Wu and Burgess, 2004; Wu *et al.*, 2003). Während 17% der MuLV im Umkreis von CpG-Inseln (± 1 kb) integrieren, kommt dies bei HIV nur bei 2% der Integrationen vor (Wu *et al.*, 2003). Außerdem integriert HIV bevorzugt in transkriptionell aktive Regionen des Wirts-Genoms (Mitchell *et al.*, 2004), was die Transkription von HIV abstammenden Vektoren fördern könnte (Schroder *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Ein anderer Grund könnte die Einführung von SIN-Mutationen (Deletion der viralen Promoter- und Verstärker-Sequenzen) in lentiviralen Vektoren sein (Miyoshi *et al.*, 1998; Zufferey *et al.*, 1998). Die SIN-Konfiguration minimiert die Anzahl der viralen Elemente, die potentielle Angriffspunkte für den zellulären Silencing-Apparat sind. Die Entwicklung retroviraler SIN-Vektoren ging bisher mit einem signifikanten Rückgang des Virustiters einher (Yee *et al.*, 1987). Einen Durchbruch konnten jedoch kürzlich Schambach *et al.* erreichen (Schambach *et al.*, 2006), die SIN-Gammaretroviren entwickelten, welche die gleichen Expressionseigenschaften und Virus-Titer wie ihre lentiviralen Gegenstücke zeigten (Schambach *et al.*, 2006). Leider wurden diese Vektoren noch nicht *in vivo* bzw. in ES-Zellen vor und nach ihrer Differenzierung untersucht (Schambach *et al.*, 2006). Da der einzige Unterschied zwischen gesilenceten und transkriptionell aktiven Proviren die Integrations-Stellen im Wirts-Genom sind, könnten diese Unterschiede auch durch die Heterogenität der genetischen Umgebung des Provirus bedingt sein (permissive oder repressive Effekte). Die Aufklärung der Mechanismen,

welche die Methylierung integrierter Lentiviren regulieren, würde helfen, die lentivirale Expression in transgenen Tieren weiter zu verbessern. Die Tatsache, daß die zelluläre Silencing-Maschinerie zu integrierten Proviren rekrutiert wird, ist auch von therapeutischem Interesse und könnte einen potentiellen Angriffspunkt für die Therapie der HIV-Infektion darstellen.

Eine Strategie zur Kontrolle der epigenetischen Regulation liegt im Einbau positiv regulatorischer Elemente in den Lentivektor: Locus Control Regions (LCRs), Chromatin-Insulatoren oder Matrix-Attachment Sequenzen (Delenda, 2004). Es wurden bereits verschiedene Chromatin-Insulatoren beschrieben, die in der Lage sind, lentivirale Expressionskassetten vor positionellen Effekten zu schützen. Die HS4-Region des Hühner- β -Globin LCRs (Bell *et al.*, 1999; Recillas-Targa *et al.*, 2002) erzielte stabile Expression lentiviraler Vektoren in hematopoietischen Stammzellen (HSC) (Ramezani *et al.*, 2003). Studien über die Struktur der Chromosom-Organisation führten zur Entdeckung der Matrix- oder Scaffold Attachment Regions (S/MARs). Diese Sequenzen flankieren normalerweise Gene oder Gen-Cluster und konnten im lentiviralen Kontext die Stabilität der Transgen-Expression in humanen HSCs erhöhen (Ramezani *et al.*, 2003). Außerdem gab es Hinweise, daß die Inkorporation von S/MAR- und HS4-Elementen in einen Lentivektor synergistische Effekte zeigt (Ramezani *et al.*, 2003).

9.5. Nachteile der Vektoren und potentielle Risiken

Einer der großen Nachteile von lentiviralen Vektoren ist die beschränkte Aufnahme-Kapazität des Vektors. Im Rahmen der Generation moderner Lentivektor-Systeme wurde der Großteil des ursprünglichen viralen Genoms deletiert (Review in (Pfeifer and Verma, 2001)). Dadurch können bis zu 8 kb an fremden cDNA-Sequenzen in das Vektor-Konstrukt inkorporiert werden. Oft sind jedoch für eine optimale Expression von Genen sehr große genomische Promotor- und Verstärker-Sequenzen nötig. Auch die An- bzw. Abwesenheit von bestimmten Intron-Sequenzen innerhalb von Genen (z.B. bei sog. Minigenen) kann entscheidenden Einfluß auf das Expressions-Profil in höheren Eukaryoten haben (Nott *et al.*, 2003). Während andere Vektoren wie z.B. BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) bis zu 300 kb an DNA aufnehmen können (Shizuya *et al.*, 1992), würde bei vielen Anwendungen die Aufnahmekapazität des Lentivektors überschritten werden.

Die Tatsache, daß lentivirale Vektoren - entgegen früherer Hypothesen - doch *in vivo* und *in vitro* epigenetisch reguliert werden können stellt eine weitere Beeinträchtigung ihrer Anwendung dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in circa einem Drittel der

untersuchten Schweine (mit Einzel-Integranen) die Expression der Proviren gesilencet wurde (siehe Kapitel 9.4). Aber auch in einer *in vitro*-Studie wurde die epigenetische Regulation lentiviraler Vektoren beobachtet (He *et al.*, 2005). In murinen embryonalen Karzinom-Zellen (P19) konnte nach lentiviraler Transduktion die Methylierung der Transgene und die Bildung von Heterochromatin gezeigt werden. Trotzdem ist die Häufigkeit und der Grad der epigenetischen Regulation bei lentiviralen Vektoren deutlich geringer als bei prototypischen Retroviren.

Ein anderer Punkt, der an dieser Stelle diskutiert werden soll, ist die Transduktions-Effizienz von Lentiviren in Präimplantationsembryonen. Offenbar scheint es in verschiedenen Spezies Unterschiede in der Embryogenese zu geben, welche die virale Infektion beeinflussen. Initiale Versuche, Affen-Blastozysten mit Lentiviren zu infizieren, waren nicht erfolgreich und führten lediglich zur Transduktion der Plazenta (Wolfgang *et al.*, 2001). Die Infektion von Morulae der Maus führte zur Erzeugung transgener Mäuse mit stark ausgeprägtem Mosaicismus (Pfeifer *et al.*, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten transgenen Schweine (aus Zygoten-Infektion) zeigten jedoch keine visuellen Unterschiede in der Transgen-Expression. Eine weitere Auffälligkeit stellte sich bei Versuchen mit Rinder-Embryonen heraus. Während transgene Schweine durch Infektion von Zygoten erzeugt werden konnten, führte dieser Ansatz bei Rindern nicht zum gewünschten Erfolg. Erst die Infektion von Oozyten (vor der Befruchtung) führte zur Geburt transgener Kälber. Dies läßt vermuten, daß der Zeitpunkt der Infektion des Embryos für den Erfolg der lentiviralen Transgenese nicht alleine ausschlaggebend ist. Offenbar gibt es Speziesunterschiede, welche die lentivirale Infektion erschweren oder blockieren können (z.B. in Rinder-Zygoten). Die Identifizierung solcher Spezies-spezifischen Faktoren wäre nicht nur für die transgene Technologie von Interesse. Es würden sich auch neue Ansätze für die Therapie der HIV-Infektionen ergeben.

Ein wichtiger Aspekt integrierender Vektoren ist die "insertional mutagenesis". Darunter versteht man die Aktivierung von Proto-Onkogenen (und damit die Konversion einer normalen Zelle in eine Tumorzelle) bedingt durch Integration viraler DNA ins Chromosom. Es konnte bereits gezeigt werden, daß prototypische Retroviren bevorzugt in die Nähe transkriptioneller Start-Sequenzen integrieren (Wu and Burgess, 2004; Wu *et al.*, 2003). Zwei Patienten, die mit MuLV-basierenden Vektoren behandelt wurden, erkrankten an Leukämie offenbar, weil der verwendete Vektor in unmittelbarer Nähe des Protoonkogen-Promoter LMO2 integrierte (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Da Retro- und Lentiviren erhebliche Unterschiede bei der Auswahl der Integrationsorte aufweisen, könnte die Verwendung lentiviraler Vektoren das Risiko der Integrations-bedingten Aktivierung von Proto-Onkogenen verringern (Baum *et al.*, 2004;

Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Kürzlich wurde in einer Studie erstmals Lentivektor-assoziierte Tumorgenese berichtet (Themis *et al.*, 2005). Nach Injektion lentiviraler Vektoren in die fötale Leber (in utero) entwickelten einige der Mäuse Tumoren (Themis *et al.*, 2005). Es gibt bisher jedoch keine Hinweise darauf, daß die lentivirale Transgenese bzw. die Infektion von Präimplantationsembryonen zu einer Tumor-Bildung in den daraus entstehenden Tieren führt. Transgene Founder-Schweine #507, #507 und #514 (siehe Abbildung 19) wurden im Alter von 3 Jahren auf diesen Aspekt hin untersucht. Diese Tiere zeigten jedoch keine pathologischen Auffälligkeiten.

9.6. Aktueller Stand der lentiviralen Transgenese

Zu Beginn der Entwicklung stand die Erzeugung lentiviral transgener Mäuse im Jahr 2002 (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Diese wurden auf verschiedenen Wegen erzeugt: (i) Infektion von ES-Zellen und anschließender Transfer in Blastozysten (Pfeifer *et al.*, 2002); (ii) Denudieren von Embryonen und Inkubation in Virus-Suspension (Pfeifer *et al.*, 2002); (iii) subzonale Virus-Injektion lentiviraler Partikel (Lois *et al.*, 2002). Alle Tiere die das Transgen trugen, zeigten Expression und gaben dieses über die Keimbahn an die nächste Generation weiter (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Zeitgleich wurden auch die ersten transgenen Ratten durch subzonale Injektion von Zygoten erzeugt (Lois *et al.*, 2002). Die von Lois *et al.* erreichten Transgenese-Raten konnte in einer späteren Studie, mit einem gleichartigen lentiviralen Vektor, verifiziert werden (van den Brandt *et al.*, 2004). Transgene Ratten konnten aber auch über einen anderen Ansatz erzeugt werden (Hamra *et al.*, 2002): Spermien-Stammzellen wurden mit lentiviralen Vektoren *in vitro* transduziert und anschließend in die Hoden männlicher Empfänger transferiert. Die Verpaarung dieser Männchen führte zur Geburt von 30% transgenen Nachkommen mit multiplen viralen Integrationen (Hamra *et al.*, 2002). Die Proviren waren in unterschiedliche genomische Regionen integriert und konnten zu ~50% an die Nachkommen weitergegeben werden (Hamra *et al.*, 2002).

Eine frühere Studie in Rhesus-Affen war weniger erfolgreich und resultierte nur in der Transduktion der Plazenta. Es konnten jedoch keine transgenen Affen erzeugt werden (Wolfgang *et al.*, 2001). Eine Ursache hierfür könnte der späte Zeitpunkt der Infektion (Virus-Injektion in die Blastozysten-Höhle) sein, wodurch nur der Trophoblast transduziert wurde (Wolfgang *et al.*, 2001).

Diese Arbeit beschreibt die ersten transgenen Schweine und Rinder, die durch Lentiviren erzeugt wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten auch Whitelaw *et al.* transgene Schweine mit lentiviralen Vektoren (basierend auf EIAV) generieren (Whitelaw *et al.*, 2004). In dieser Studie wurden sogar Transgenese-Raten von 31% (bezogen auf die infizierten und transferierten Embryonen) erreicht (siehe Tabelle 7). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß 95% der transgenen Founder das lentivirale Transgen (eGFP) exprimierten (Whitelaw *et al.*, 2004).

Hühner sind eine weitere Spezies, die erfolgreich mit Lentiviren transduziert werden konnte (Chapman *et al.*, 2005; McGrew *et al.*, 2004). Lentivirale Partikel wurden in den subgerminalen Hohlraum unter der Keimscheibe injiziert. Die geborenen Hähne trugen den Provirus und exprimierten diesen. Hühner-Embryos bestehen zum Zeitpunkt der Infektion schätzungsweise aus 60.000 Zellen, von denen sich vermutlich nur 50 zu primordialen Keimbahnzellen entwickeln (Karagenc *et al.*, 1996). Trotzdem konnten die integrierten Proviren an die nächste Generation weitergegeben werden (McGrew *et al.*, 2004). Dies verdeutlicht sehr eindrucksvoll die hohe Effizienz des lentiviralen Verfahrens (100fach höher als die bisher verwendeten Methoden) (McGrew *et al.*, 2004). Auch die Infektion der Keimscheiben von Wachteln führte zur Geburt von Mosaik-Tieren (Scott and Lois, 2005). Der verwendete Vektor trug den humanen Synapsin-I Promoter, wodurch die Transgen-Expression Neuronen-spezifisch war (Scott and Lois, 2005).

9.7. Ausblick

9.7.1. Lentivirale Transgenese und Kerntransfer

Als eine weitere Methode zur Erzeugung lentiviral transgener Rinder wurde in dieser Arbeit der Kerntransfer untersucht. LV-PGK transduzierte Haut-Fibroblasten vom Rind wurden als Donor-Zellen für den Kerntransfer eingesetzt. Damit sollten die Auswirkungen der epigenetischen Reprogrammierung des Zellkerns auf die Expression der Proviren untersucht werden. Obwohl dieser Ansatz wesentlich ineffizienter war als die direkte Infektion von Rinder-Oozyten, konnte ein Rind erzeugt werden, welches starke eGFP-Expression zeigte.

Die Tatsache, daß lentivirale Integrierten durch den Klon-Prozess nicht abgeschaltet werden, eröffnet viele Möglichkeiten für die Produktion transgener Tiere. Durch die gezielte Wahl von Spender-Zellen (Generierung und Charakterisierung von Zellklonen), können Tiere mit bestimmten Eigenschaften generiert werden: (i) Tiere mit definierter Integriertenzahl. (ii) Tiere

mit bestimmten Transgen Expressions-Leveln. (iii) Multi-transgene Tiere (nach Mehrfach-Infektion der Spenderzellen mit verschiedenen Konstrukten). (iv) Transgene Tiere auf einem Knockout-Hintergrund (durch lentivirale Infektion von Zellen, die eine Null-Mutation eines Gens tragen). Ein großer Nachteil des Verfahrens ist jedoch die hohe Abort-Rate, die nach dem NT auftritt (~2% transgene Rinder bezogen auf die behandelten Embryonen im Vergleich zu 50% bei Oozyten-Infektion). Auch andere Studien, die fetale Fibroblasten als Spenderzellen nutzten, zeigten ähnliche Abort-Raten und lieferten Effizienzen zwischen 0 und 3,8% (Hill *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2000; Lanza *et al.*, 2000; Zakhartchenko *et al.*, 1999; Zakhartchenko *et al.*, 2001).

9.7.2. Lentiviral vermittelte RNA-Interferenz

Die Injektion doppelsträngiger (ds)RNA in *Caenorhabditis elegans* führte zu einem spezifischen und effizienten Gen-Silencing (Fire *et al.*, 1998). Dieser Vorgang wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet (Fire *et al.*, 1998). RNAi wird durch kleine 21- bis 25-Nukleotid große RNAs induziert. Diese RNAs entstehen aus doppelsträngigen Vorläufermolekülen durch die Ribonuklease-III/RNA-Helikase Dicer (Tijsterman *et al.*, 2002) und an den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) gebunden (Hammond *et al.*, 2000). Nach der Aufspaltung der siRNA (small interfering RNA) erfolgt die RISC-vermittelte Erkennung und Spaltung der Ziel-mRNA (Martinez *et al.*, 2002; Nykanen *et al.*, 2001). Die Degradierung der Ziel-mRNA ist ein Prozess, der weitläufig als "knock-down" von Genen bezeichnet wird und zur Untersuchung der Genfunktion benutzt werden kann (Baulcombe, 2004; Hannon and Rossi, 2004; Mello and Conte, 2004).

Neben der transienten Transfektion von siRNA-Duplexen kann RNAi auch durch Promotor-vermittelte Expression von shRNAs (short hairpin RNAs) induziert werden. Hierzu werden hauptsächlich die Polymerase (Pol) III Promotoren "H1" (Abbas-Terki *et al.*, 2002; Brummelkamp *et al.*, 2002) oder "U6" (Lee *et al.*, 2002) verwendet. ShRNAs werden *in vitro* oder *in vivo* von Dicer zu siRNAs prozessiert. Die konstante shRNA-Expression ist die Voraussetzung für einen dauerhaften und stabilen knock-down. Da Lentiviren in das Genom des Wirts-Organismus integrieren, sind sie in der Lage dies zu gewährleisten (Stewart *et al.*, 2003). Durch Lentivektor induzierte RNAi konnte in verschiedenen Zellenlinien und im Maus-Modell ein spezifischer und stabiler knock-down der Ziel-Gene gezeigt werden (Rubinson *et al.*, 2003; Tiscornia *et al.*, 2003). Obwohl durch RNAi meist kein kompletter knock-down erreicht werden kann, stellt die lentiviral induzierte RNAi einen schnellen und effizienten Weg zur Untersuchung

von Gen-Funktionen und eine potente Alternative zur klassischen knock-out (k.o.) Methode dar (Peng *et al.*, 2006). Besonders bei höheren Säugetieren, wie Schweinen und Rindern, ist die Erzeugung von k.o.-Tieren langwierig und kostspielig. Die gängige Methode basiert auf dem Transfer von somatischen Zellkernen, die ein ausgeschaltetes Gen tragen, in entkernte Eizellen. Die Nachteile der Klon-Methode wurden bereits ausführlich diskutiert (siehe Kapitel 9.7.1). Zur Erzeugung eines Phänotyps müssen in vielen Fällen beide Allele ausgeschaltet werden. Dies ist jedoch nur durch aufwendige Zuchtverfahren möglich, so daß es zur sogenannten "inbreeding depression" kommen kann (Review in (Clark and Whitelaw, 2003)).

9.7.3. Einsatz regulierbarer Vektoren

Unter den bisher entwickelten regulierbaren Transgen-Expressionssystemen (Brown *et al.*, 1994; Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995; No *et al.*, 1996; Suhr *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994) ist das sogenannte tet-on/tet-off System am besten charakterisiert (Baron *et al.*, 1997; Blau and Rossi, 1999; Gossen *et al.*, 1995). Von diesem konnte bereits mehrfach die Funktion und Leistungsfähigkeit im lentiviralen Kontext gezeigt werden (Johansen *et al.*, 2002; Kafri *et al.*, 2000; Ogueta *et al.*, 2001; Regulier *et al.*, 2002; Reiser *et al.*, 2000; Vigna *et al.*, 2002). Das System besteht aus zwei Komponenten: (i) dem *trans*-aktivierenden Induktor (tTA) bzw. Repressor (tTR) und (ii) dem *cis*-induzierbaren Operator (*tet*-responsives Element). Die Aktivierung der Transgen-Expression durch das tet-on/tet-off System ist dosisabhängig und kann schnell an bzw. abgeschaltet werden. Ein großes Problem dieses Systems war jedoch die unvollständige Aktivierung oder Abschaltung der Transgen-Expression. Ein neu entwickeltes, auf das tet-on/tet-off System aufbauendes System, ermöglicht nun sogar die induzierbare und gewebespezifische Expression von Transgenen und shRNAs (Szulc *et al.*, 2006). Das tTRKRAB-System basiert auf der Fusion des tet-Repressors mit der Krüppel-assoziierten Box (KRAB). Wird KRAB an DNA gebunden rekrutiert es Transkriptions-Suppressoren, was zu Histon-Deacetylierung, DNA-Methylierung sowie zur Bindung des Heterochromatin-Protein 1 (HP-1) führt. Auf diese Weise wird ein Heterochromatin-Zustand erzeugt, welcher über einen Radius von $\pm 2-3$ kb reicht (Moosmann *et al.*, 1997; Senatore *et al.*, 1999; Wiznerowicz and Trono, 2003). Das neue System erwies sich als sehr vielseitig (Szulc *et al.*, 2006).

Ein weiterer Weg zur Regulation der Transgen-Expression ist die Deletion von Proviren zu einem gewünschten Zeitpunkt. Rekombinatorische Systeme wie das Cre-loxP System wurden bereits in Lentivektor-basierenden Gentransfer-Modellen verwendet (Chang and Zaiss, 2003;

Mitta *et al.*, 2002; Salmon *et al.*, 2000). Hierzu wurden 34bp cis-aktive (loxP) Sequenzen in die mutierte U3-Region des 3'-LTRs inkorporiert. Durch die Verdopplung der LTRs bei der Integration der viralen DNA entsteht somit ein von loxP-Sequenzen flankierter (gefloxter) Provirus, der durch die Cre-Rekombinase komplett entfernt werden kann (Chang and Zaiss, 2003; Mitta *et al.*, 2002; Salmon *et al.*, 2000).

10. Zusammenfassung

Die ersten transgenen Tiere wurden durch viralen Gentransfer erzeugt. Für die initialen Versuche wurden prototypische Retroviren, wie der murine Leukämievirus (MuLV), verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, daß die proviralen Gene in diesen Mäusen stark methyliert waren und nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert wurden ("gene silencing"). Ein Durchbruch für die virale Transgenese kam erst mit der Verwendung lentiviraler Vektoren. Lentiviren sind in der Lage eine Vielzahl verschiedener Zelllinien (auch terminal differenzierte Zellen) effizient zu transduzieren und ihre virale DNA stabil in das Wirts-Chromosom zu integrieren. Obwohl bereits transgene Nagetiere durch lentivirale Vektoren erzeugt werden konnten, waren initiale Versuche in höheren Säugetieren (Affen) nicht erfolgreich. Dies warf die Frage auf, ob lentiviraler Gentransfer in höheren Säugetieren anwendbar ist. Transgene Schweine und Rinder wären von großer biomedizinischer Bedeutung. Ihre potentiellen Anwendungsmöglichkeiten reichen von der Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine über klinische Modelle zur Untersuchung humaner Erkrankungen bis hin zur Xenotransplantation.

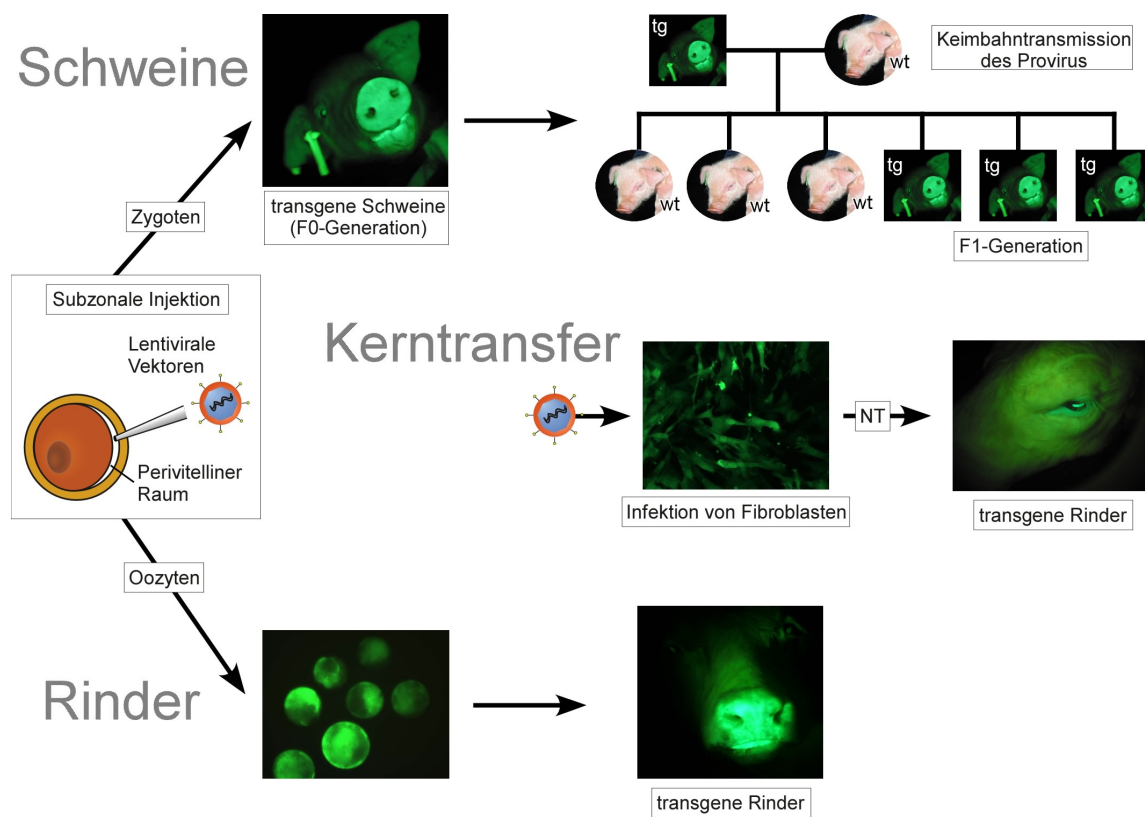


Abbildung 69. Zusammenfassung der durchgeführten Abreiten. Erzeugung transgener Schweine (oben). Erzeugung transgener Rinder durch Oozyten-Infektion (unten). Erzeugung transgener Rinder durch NT (mitte).

Obwohl mit der klassischen DNA-Mikroinjektion transgene Schweine und Rinder erzeugt werden können, ist das Verfahren in diesen Spezies jedoch sehr ineffizient und dementsprechend kostenintensiv. Da hohe Produktionskosten den möglichen Anwendungen entgegenstehen, wurde versucht ein effizientes Verfahren, daß auf lentiviralem Gentransfer beruht, zu entwickeln.

Für die Entwicklung der lentiviralen Transgenese in Schweinen wurden Zygoten mit Lentiviren infiziert und in Empfänger transferiert. Die verwendeten Vektoren trugen einen eGFP-Reporter, um die Effizienz der Transduktion schnell und einfach beurteilen zu können. Von den 46 geborenen Ferkeln waren 32 transgen und 30 zeigten Transgen-Expression (65%). Die hohe Transgenese-Rate, die mit dem lentiviralen Gentransfer erreicht werden konnte, stellt eine 27fache Steigerung der Effizienz im Vergleich zur klassischen DNA-Mikroinjektion dar. Die Untersuchung der transgenen Ferkel zeigte Transgen-Expression in allen Organen und keinen sichtbaren Mosaicismus der F0-Tiere. Des weiteren konnte eine nahezu lineare Korrelation zwischen der Anzahl der integrierten Proviren und der Höhe der Transgen-Expression gezeigt werden. Die Expression der lentiviralen Transgene war stabil und wurde nicht nach der Geburt der Tiere abgeschaltet. Durch die Wahl geeigneter Promotoren war es möglich sowohl ubiquitäre, als auch Gewebe-spezifische Expression (in der Haut) zu erreichen. Die integrierten Proviren wurden über die Keimbahn an die nächste Generation weitergegeben und in der F1-Generation unverändert stark exprimiert. Die Weitergabe der integrierten Proviren an die nächste Generation ist die Basis für Erzeugung transgener Linien.

Zur Erzeugung transgener Rinder wurden initial ebenfalls Zygoten infiziert. Diese wurden *in vitro* bis zum Blastozysten-Stadium (Tag 7) kultiviert. Überraschenderweise zeigten die Blastozysten nur sehr geringe Transgen-Expression. Nachdem durch Transfer solcher Blastozysten keine transgenen Nachkommen erzeugt werden konnten, wurde zur Infektion von Oozyten (vor der Befruchtung) gewechselt. In den aus Oozyten-Infektion stammenden Blastozysten war die Gentransfer-Rate wesentlich höher (insgesamt 83% eGFP⁺ Blastozysten) und die eGFP-Fluoreszenz um ein Vielfaches intensiver. Acht eGFP-positive Blastozysten wurden in vier Empfänger transferiert, was zur Geburt von vier transgenen Rindern führte. Alle erzeugten transgenen Rinder zeigten stabile Expression des Transgens in allen untersuchten Organen.

Als eine weitere Methode zur Erzeugung lentiviral transgener Rinder wurde der Kerntransfer (NT) untersucht. Hierzu wurden Haut-Fibroblasten vom Rind lentiviral transduziert und als Donor-Zellen verwendet. Dieser Ansatz war zwar wesentlich ineffizienter als die direkte

Infektion von Oozyten, trotzdem konnte ein transgenes Rind erzeugt werden, das starke Transgen-Expression zeigte. Da die Expression lentiviraler Integranten offenbar durch das klassische Klonen nicht abgeschaltet wird, eröffnet diese Methode viele Möglichkeiten für die Produktion transgener Tiere.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die epigenetische Regulation lentiviraler Vektoren untersucht. Dazu wurden transgene Founder-Schweine verpaart, um Tiere mit einzelnen lentiviralen Integranten (F1-Generation) zu erzeugen. Die Expressions-Analyse dieser Schweine zeigte, daß etwa 1/3 der Proviren nur schwach bzw. gar nicht exprimierten. Durch Southern Blot Analysen mit Methylierungs-sensitiven Restriktions-Enzymen wurde der Grad der proviralen Methylierung bestimmt. Dieser korrelierte negativ mit der Transgen-Expression. Zur genaueren Analyse der Methylierungs-Dichte wurden die verschiedenen Proviren mittels Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Es stellte sich heraus, daß in den schwach bzw. nicht-exprimierenden Integranten nahezu alle CpG-Dinukleotide innerhalb der untersuchten Sequenzen methyliert waren. Um den Einfluß der Methylierung auf die Expression zu untersuchen, wurde von einem nicht-exprimierenden Schwein Haut-Fibroblasten isoliert und mit dem Methylase-Inhibitor 5-AzaC inkubiert. Dadurch konnte die abgeschaltete eGFP-Expression wieder reaktiviert werden. Dagegen hatte der Histon-Deacetylase Inhibitor TSA keinen starken Einfluß auf die Transgen-Expression. Chromatin-Modifikationen durch TSA-abhängige HDACs scheinen also bei der epigenetischen Regulation lentiviraler Vektoren in Schweinen keine entscheidende Rolle zu spielen. Abschließend konnte durch einen Methylierungs-sensitiven Southern Blot gezeigt werden, daß der Grad der DNA-Methylierung durch Hemmung zellulärer Methylasen (mit 5-AzaC) signifikant reduziert wurde.

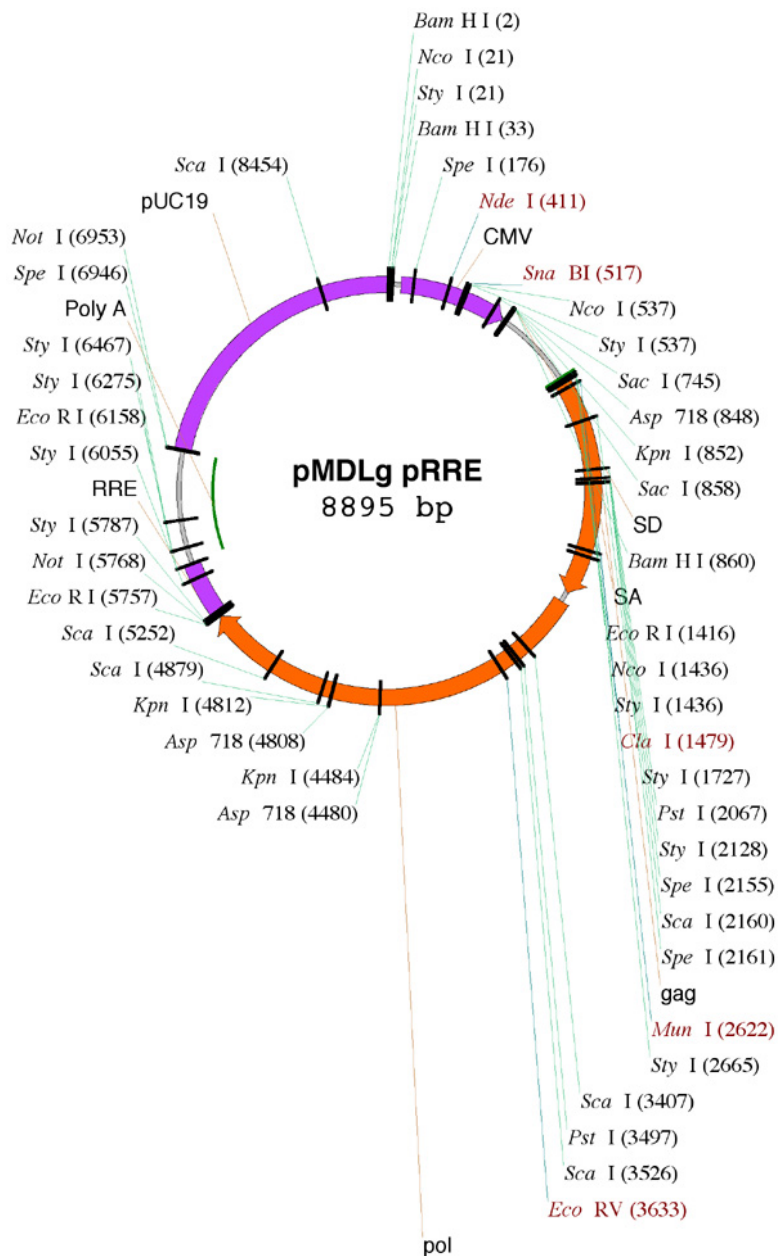
Lentiviraler Gentransfer stellte sich als eine sehr effiziente Methode zur Erzeugung transgener Schweine und Rinder heraus. Das Verfahren zeichnet sich insbesondere durch hohe Transgenese-Raten und hohe Transgen-Expression aus. Außerdem werden die lentiviralen Integranten über die Keimbahn an die nächste Generation weitergegeben. Obwohl die Transkription einiger Proviren epigenetisch reguliert wurde, ist die Häufigkeit des aufgetretenen Silencings deutlich geringer als bei prototypischen Retroviren.

11. Anhang

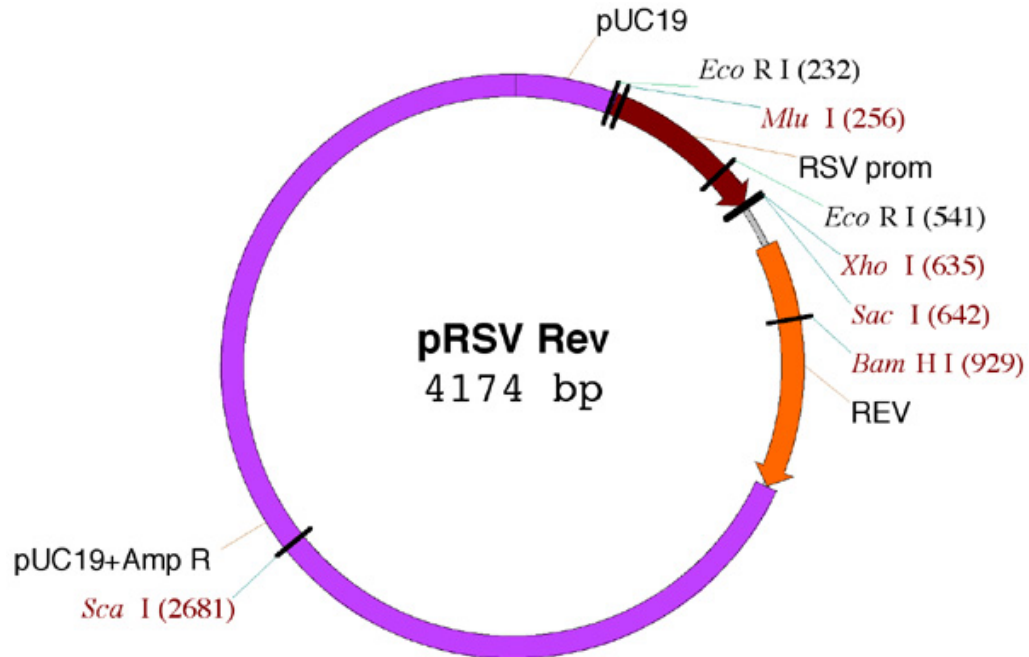
11.1. Vektor-Maps

Alle Vektor-Maps stammen von der Homepage der Lentiviral Vector Production Unit (LVPU).
(<http://www.medecine.unige.ch/~salmon/lvpu/>)

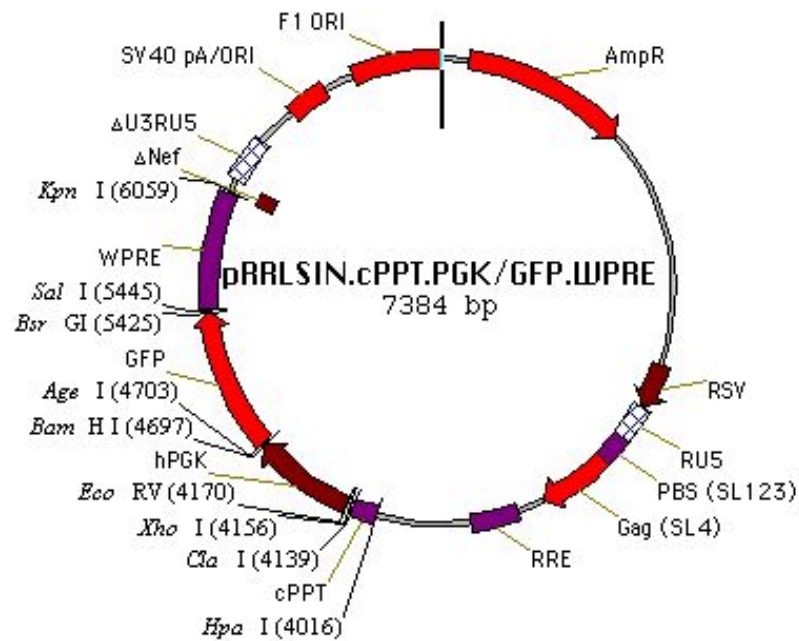
pMDLg/pRRE



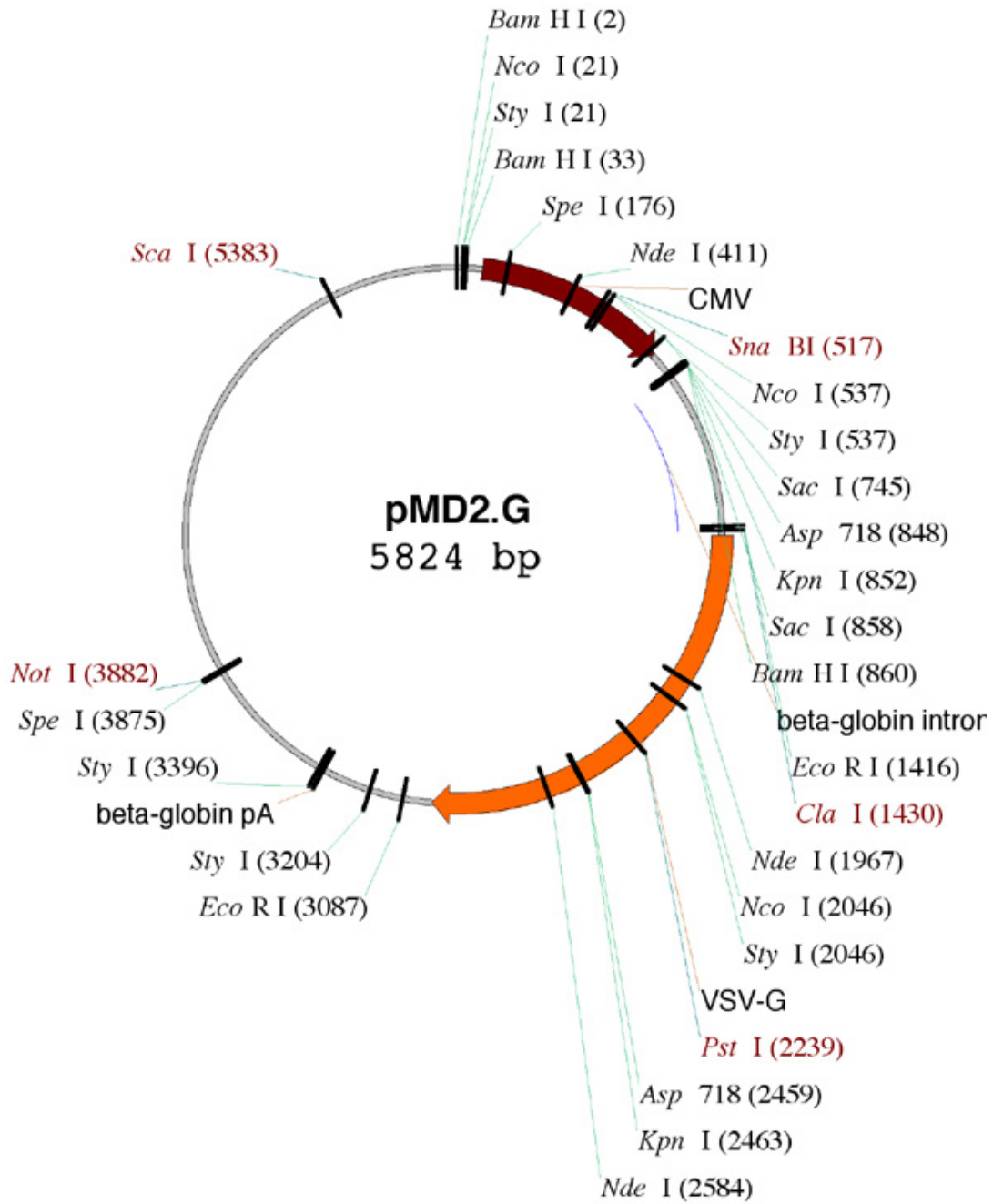
RSV-Rev



pRRL.SIN-18

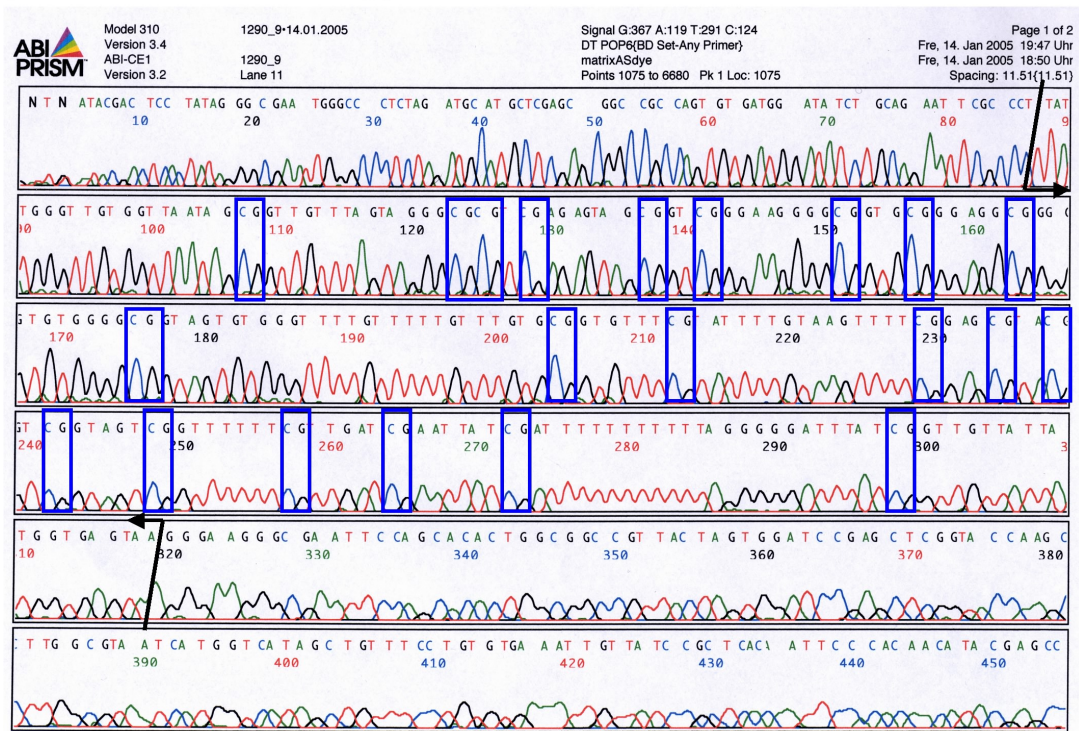


pMD.G

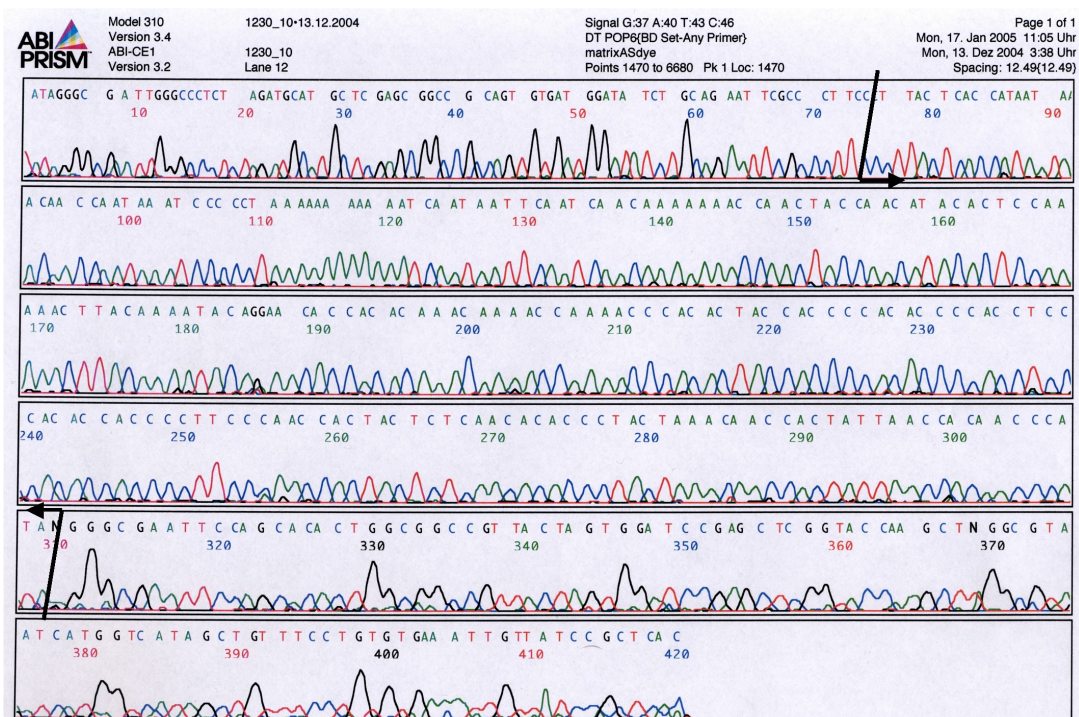


11.2. Bisulfite-Sequenzierung

Beispiel-Sequenzierung eines methylierten DNA-Fragments
(forward, CGs blau hinterlegt):



Beispiel-Sequenzierung eines nicht-methylierten DNA-Fragments
(reverse, Sequenz enthält keine GCs):



12. Zitierte Literatur

- Abbas-Terki T *et al.* (2002) Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* **13**: 2197-2201.
- Aiken C. (1997) Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* **71**: 5871-5877.
- Akkina RK *et al.* (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* **70**: 2581-2585.
- Baron U *et al.* (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* **25**: 2723-2729.
- Barry SC *et al.* (2000) Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells for expression of human CD40 ligand. *Hum Gene Ther* **11**: 323-332.
- Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363.
- Baum C *et al.* (2004) Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* **9**: 5-13.
- Bednarik DP *et al.* (1990) Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency. *Embo J* **9**: 1157-1164.
- Bell AC *et al.* (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**: 387-396.
- Berger EA *et al.* (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**: 657-700.
- Berglund JA *et al.* (1997) A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* **25**: 1042-1049.
- Bestor TH. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**: 2395-2402.
- Bird AP and Wolffe AP. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**: 451-454.
- Blau HM and Rossi FM. (1999) Tet B or not tet B: advances in tetracycline-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 797-799.
- Blomer U *et al.* (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* **71**: 6641-6649.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bremel RD *et al.* (1989) Alteration of milk composition using molecular genetics. *J Dairy Sci* **72**: 2826-2833.
- Brinster RL *et al.* (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27**: 223-231.
- Brinster RL *et al.* (1985) Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4438-4442.
- Brophy B *et al.* (2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol* **21**: 157-162.
- Brown EJ *et al.* (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**: 756-758.
- Brummelkamp TR *et al.* (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-553.
- Campbell KH. (1999) Nuclear transfer in farm animal species. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 245-252.

- Chalfie M. (1995) Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **62**: 651-656.
- Chalfie M *et al.* (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chan AW *et al.* (1998) Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14028-14033.
- Chang LJ and Zaiss AK. (2003) Self-inactivating lentiviral vectors and a sensitive Cre-loxP reporter system. *Methods Mol Med* **76**: 367-382.
- Chapman SC *et al.* (2005) Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development*.
- Clark AJ. (1998) The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**: 337-350.
- Clark J and Whitelaw B. (2003) A future for transgenic livestock. *Nat Rev Genet* **4**: 825-833.
- Clark SJ *et al.* (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**: 2990-2997.
- Clever JL *et al.* (2000) A heterologous, high-affinity RNA ligand for human immunodeficiency virus Gag protein has RNA packaging activity. *J Virol* **74**: 541-546.
- Coffin JM. (1990) Retroviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology*, 2nd edn. Raven Press, New York, pp 1437-1500.
- Coffin JM. (1992) Structure and classification of retroviruses. In: Levy J (ed) *The Retroviridae*, Vol 1. Plenum Press, New York, pp 19-50.
- Cooper DN. (1983) Eukaryotic DNA methylation. *Hum Genet* **64**: 315-333.
- Cormack BP *et al.* (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Cubitt AB *et al.* (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455.
- Delenda C. (2004) Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S125-138.
- Desrosiers RC. (2001) Nonhuman lentiviruses. In: Howley PM, Knipe DM, Griffin D, Lamb RA, Martin A, Roizman B and Straus SE (eds.) *Fields Virology*, (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 2095-2121.
- Doms RW and Moore JP. (2000) HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* **151**: F9-14.
- Doolittle RF *et al.* (1990) Retrovirus phylogeny and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**: 1-18.
- Dull T *et al.* (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**: 8463-8471.
- Dvorin JD *et al.* (2002) Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* **76**: 12087-12096.
- Dyck MK *et al.* (2003) Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends Biotechnol* **21**: 394-399.
- Ellis J and Yao S. (2005) Retrovirus silencing and vector design: relevance to normal and cancer stem cells? *Curr Gene Ther* **5**: 367-373.
- Ertl C and Wrobel KH. (1992) Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Histochemistry* **97**: 161-171.
- Fassler R. (2004) Lentiviral transgene vectors. *EMBO Rep* **5**: 28-29.
- Fire A *et al.* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

- Follenzi A *et al.* (2000) Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* **25**: 217-222.
- Frommer M *et al.* (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1827-1831.
- Galla M *et al.* (2004) Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation. *Mol Cell* **16**: 309-315.
- Gallo RC and Montagnier L. (1987) The chronology of AIDS research. *Nature* **326**: 435-436.
- Garner I and Colman A. (1998) Therapeutic proteins from livestock. In *Animal Breeding — Technology for the 21st Century*, ed. Clark, A. J., pp. 215—227. Overseas Publishers Association, Amsterdam.
- Gasmi M *et al.* (1999) Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* **73**: 1828-1834.
- Gossen M and Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5547-5551.
- Gossen M *et al.* (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**: 1766-1769.
- Gottlinger HG *et al.* (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5781-5785.
- Goujon C *et al.* (2003) Heterologous human immunodeficiency virus type 1 lentiviral vectors packaging a simian immunodeficiency virus-derived genome display a specific postentry transduction defect in dendritic cells. *J Virol* **77**: 9295-9304.
- Hacein-Bey-Abina S *et al.* (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415-419.
- Hamaguchi I *et al.* (2000) Lentivirus vector gene expression during ES cell-derived hematopoietic development in vitro. *J Virol* **74**: 10778-10784.
- Hammond SM *et al.* (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Hamra FK *et al.* (2002) Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14931-14936.
- Hannon GJ and Rossi JJ. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**: 371-378.
- He J *et al.* (2005) Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells. *J Virol* **79**: 13497-13508.
- Heim R *et al.* (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12501-12504.
- Hill JR *et al.* (2000) Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* **62**: 1135-1140.
- Hino S *et al.* (2004) Sea urchin insulator protects lentiviral vector from silencing by maintaining active chromatin structure. *Gene Ther* **11**: 819-828.
- Hirsch M and Curran J. (1996) in: B. Fields, D. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, Lipincott-Raven, Philadelphia, 1996, pp. 1953–1975.
- Inouye S and Tsuji FI. (1994) Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett* **351**: 211-214.
- Iwakuma T *et al.* (1999) Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* **261**: 120-132.
- Jacks T *et al.* (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**: 280-283.

- Jaenisch R. (1976) Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 1260-1264.
- Jaenisch R and Mintz B. (1974) Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1250-1254.
- Jahner D and Jaenisch R. (1980) Integration of Moloney leukaemia virus into the germ line of mice: correlation between site of integration and virus activation. *Nature* **287**: 456-458.
- Jahner D *et al.* (1982) De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298**: 623-628.
- Jhala US *et al.* (2003) cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* **17**: 1575-1580.
- Johansen J *et al.* (2002) Evaluation of Tet-on system to avoid transgene down-regulation in ex vivo gene transfer to the CNS. *Gene Ther* **9**: 1291-1301.
- Jones PA and Takai D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**: 1068-1070.
- Jones PL *et al.* (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**: 187-191.
- Kafri T *et al.* (1997) Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* **17**: 314-317.
- Kafri T *et al.* (2000) Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* **1**: 516-521.
- Kao SY *et al.* (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**: 489-493.
- Karagenc L *et al.* (1996) Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev Genet* **19**: 290-301.
- Kato Y *et al.* (2000) Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* **120**: 231-237.
- Kim VN *et al.* (1998) Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**: 811-816.
- Kues WA and Niemann H. (2004) The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol* **22**: 286-294.
- Kühnel W. (1992) *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laker C *et al.* (1998) Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* **72**: 339-348.
- Lanza RP *et al.* (2000) Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* **288**: 665-669.
- Lee NS *et al.* (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20**: 500-505.
- Lever AM *et al.* (2004) Lentiviral vectors. *J Biomed Sci* **11**: 439-449.
- Limon A *et al.* (2002) Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. *J Virol* **76**: 12078-12086.
- Lois C *et al.* (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**: 868-872.
- Maga EA and Murray JD. (1995) Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology (N Y)* **13**: 1452-1457.
- Marshall J *et al.* (1995) The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* **14**: 211-215.

- Martinez J *et al.* (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574.
- McClure MO *et al.* (1988) Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *Embo J* **7**: 513-518.
- McGraw-Hill. (1997) Developmental Psychology Image Bank.
<http://www.mhhe.com/socscience/devel/ibank/image/0031.jpg>.
- McGrew MJ *et al.* (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* **5**: 728-733.
- Mello CC and Conte D, Jr. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**: 338-342.
- Michelson AM *et al.* (1983) Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X chromosome-encoded phosphoglycerate kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 472-476.
- Miller DG *et al.* (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* **10**: 4239-4242.
- Mitchell RS *et al.* (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* **2**: E234.
- Mitta B *et al.* (2002) Advanced modular self-inactivating lentiviral expression vectors for multigene interventions in mammalian cells and in vivo transduction. *Nucleic Acids Res* **30**: e113.
- Miyoshi H *et al.* (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* **72**: 8150-8157.
- Miyoshi H *et al.* (1997) Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10319-10323.
- Modrow S *et al.* (2003) *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag.
- Moffat AS. (1998) Improving gene transfer into livestock. *Science* **282**: 1619-1620.
- Mohamedali A *et al.* (2004) Self-inactivating lentiviral vectors resist proviral methylation but do not confer position-independent expression in hematopoietic stem cells. *Mol Ther* **10**: 249-259.
- Moore JP and Doms RW. (2003) The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10598-10602.
- Moosmann P *et al.* (1997) Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol Chem* **378**: 669-677.
- Muller M and Brem G. (1998) Transgenic approaches to the increase of disease resistance in farm animals. *Rev Sci Tech* **17**: 365-378.
- Munz B *et al.* (1999) Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *Embo J* **18**: 5205-5215.
- Naldini L *et al.* (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267.
- Nan X *et al.* (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.
- Niemann H and Kues W. (2003) Progress in Xenotransplantation Research Employing Transgenic Pigs. *Tx Med* **15**: 3-14.
- Niemann H and Kues WA. (2003) Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci* **79**: 291-317.
- No D *et al.* (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3346-3351.

- Notari RE and DeYoung JL. (1975) Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *J Pharm Sci* **64**: 1148-1157.
- Nott A *et al.* (2003) A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *Rna* **9**: 607-617.
- Nykanen A *et al.* (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**: 309-321.
- Ogueta SB *et al.* (2001) Design and in vitro characterization of a single regulatory module for efficient control of gene expression in both plasmid DNA and a self-inactivating lentiviral vector. *Mol Med* **7**: 569-579.
- Okano M *et al.* (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257.
- Palmiter RD *et al.* (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**: 611-615.
- Pannell D *et al.* (2000) Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *Embo J* **19**: 5884-5894.
- Parkin NT *et al.* (1992) Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* **66**: 5147-5151.
- Peng S *et al.* (2006) A transgenic approach for RNA interference-based genetic screening in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2252-2256.
- Pfeifer A. (2004) Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* **13**: 513-522.
- Pfeifer A *et al.* (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2140-2145.
- Pfeifer A *et al.* (2001) Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* **3**: 319-322.
- Pfeifer A and Verma IM. (2001) Virus vectors and their application. In Howley PM, Knipe DM, Griffin D, Lamb RA, Martin A, Roizman B and Straus SE (eds.) *Fields Virology*, (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 469-491.
- Platt JL. (2002) Knocking out xenograft rejection. *Nat Biotechnol* **20**: 231-232.
- Prather RS *et al.* (2003) Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* **59**: 115-123.
- Pursel V. (1998) Modification of production traits. In *Animal Breeding — Technology for the 21st Century*, ed. Clark, A. J., pp. 183—200, Overseas Publishers Association, Amsterdam.
- Ramezani A *et al.* (2003) Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood* **101**: 4717-4724.
- Recillas-Targa F *et al.* (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6883-6888.
- Regulier E *et al.* (2002) Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* **13**: 1981-1990.
- Reh WA *et al.* (2004) Hot topic: using a stearyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J Dairy Sci* **87**: 3510-3514.
- Reik W *et al.* (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093.
- Rein T *et al.* (1997) Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides. *Mol Cell Biol* **17**: 416-426.

- Reiser J *et al.* (2000) Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol* **74**: 10589-10599.
- Rizzuto CD *et al.* (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**: 1949-1953.
- Robertson KD and Wolffe AP. (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**: 11-19.
- Rubinson DA *et al.* (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**: 401-406.
- Rudolph NS. (1999) Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol* **17**: 367-374.
- Saiki RK *et al.* (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Salmon P *et al.* (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* **2**: 404-414.
- Schambach A *et al.* (2006) Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *Mol Ther* **13**: 391-400.
- Schroder AR *et al.* (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**: 521-529.
- Scott BB and Lois C. (2005) Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16443-16447.
- Senatore B *et al.* (1999) A variety of RNA polymerases II and III-dependent promoter classes is repressed by factors containing the Kruppel-associated/finger preceding box of zinc finger proteins. *Gene* **234**: 381-394.
- Shaunak S and Weber JN. (1992) The retroviruses: classification and molecular biology. *Baillieres Clin Neurol* **1**: 1-21.
- Shizuya H *et al.* (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8794-8797.
- Singer-Sam J *et al.* (1983) Isolation of a cDNA clone for human X-linked 3-phosphoglycerate kinase by use of a mixture of synthetic oligodeoxyribonucleotides as a detection probe. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 802-806.
- Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Spector DH *et al.* (1990) Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J Virol* **64**: 2298-2308.
- Speers WC *et al.* (1980) Silent infection of murine embryonal carcinoma cells by Moloney murine leukemia virus. *Virology* **105**: 241-244.
- Starcich B *et al.* (1985) Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science* **227**: 538-540.
- Stewart SA *et al.* (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna* **9**: 493-501.
- Stojkovic M *et al.* (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* **64**: 904-909.

- Suhr ST *et al.* (1998) High level transactivation by a modified Bombyx ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7999-8004.
- Swanstrom R and Wills JW. (1997) Synthesis, assembly and processing of viral protein. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press, 263–334;1997.
- Szulc J *et al.* (2006) A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* **3**: 109-116.
- Teich NM *et al.* (1977) Virus infection of murine teratocarcinoma stem cell lines. *Cell* **12**: 973-982.
- Themis M *et al.* (2005) Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol Ther* **12**: 763-771.
- Tijsterman M *et al.* (2002) The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* **36**: 489-519.
- Tiscornia G *et al.* (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1844-1848.
- van den Brandt J *et al.* (2004) Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo. *Genesis* **39**: 94-99.
- Vassar R *et al.* (1989) Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 1563-1567.
- Vigna E *et al.* (2002) Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol Ther* **5**: 252-261.
- Wall RJ. (1996) Transgenic livestock - progress and prospects for the future. *Theriogenology* **45**: 57-68.
- Wang Y *et al.* (1994) A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8180-8184.
- Wells K *et al.* (1999) Transgene vectors go retro. *Nat Biotechnol* **17**: 25-26.
- Welsch U. (2001) *SOBOTTA ATLAS HISTOLOGIE Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. Urban & Fischer.
- Wheeler MB. (2003) Production of transgenic livestock: promise fulfilled. *J Anim Sci* **81 Suppl 3**: 32-37.
- Whitelaw CB *et al.* (2004) Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* **571**: 233-236.
- Wiznerowicz M and Trono D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77**: 8957-8961.
- Wolf E. (2003) Kerntransfer-Klonierung - Anwendungen in der Biotechnologie und Tierzucht. <http://aet-d.de/de/klonen.htm>.
- Wolf E. (2005) Nutztiere – quo vadite? Neue Wege durch funktionale Genomanalyse. http://www.fugato-forschung.de/download.php/29/nutztiere_wolf_neu.pdf.
- Wolfgang MJ *et al.* (2001) Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10728-10732.
- Wu X and Burgess SM. (2004) Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2588-2596.
- Wu X *et al.* (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**: 1749-1751.
- Wyatt R and Sodroski J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**: 1884-1888.
- Yanez-Munoz RJ *et al.* (2006) Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* **12**: 348-353.

- Yang TP *et al.* (1988) DNA binding factors for the CpG-rich island containing the promoter of the human X-linked PGK gene. *Somat Cell Mol Genet* **14**: 461-472.
- Yang TT *et al.* (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* **24**: 4592-4593.
- Yao S *et al.* (2004) Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* **10**: 27-36.
- Yee JK *et al.* (1987) Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5197-5201.
- Zakhartchenko V *et al.* (1999) Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil* **115**: 325-331.
- Zakhartchenko V *et al.* (2001) Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Mol Reprod Dev* **60**: 362-369.
- Zennou V *et al.* (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* **19**: 446-450.
- Zernicka-Goetz M *et al.* (1997) Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* **124**: 1133-1137.
- Zuelke KA. (1998) Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reprod Fertil Dev* **10**: 671-676.
- Zufferey R *et al.* (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**: 2886-2892.
- Zufferey R *et al.* (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* **72**: 9873-9880.
- Zufferey R *et al.* (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**: 871-875.

13. Veröffentlichungen, Abstracts und Preise

13.1. Veröffentlichungen

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2003) *Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors*. EMBO Rep. 2003 Nov; 4(11):1054-60.

Pfeifer A, **Hofmann A**, Kessler B, Wolf E. (2004) *Response to Whitelaw: Lentiviral transgenesis in livestock*. Trends Biotechnol. 2004 Mar; 22(4):159-160

Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2004) *Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes*. Biol Reprod. 2004 Aug;71(2):405-9.

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2005) *Epigenetic Regulation of Lentiviral Transgene Vectors in a Large Animal Model*. Mol Ther. 2006 Jan;13(1):59-66.

Ewerling S*, **Hofmann A***, Klose R, Weppert M, Brem G, Rink K, Pfeifer A, Wolf E (2006) *Evaluation of Laser-Assisted Lentiviral Transgenesis in Bovine*. Transgenic Res. Manuskript zur Veröffentlichung angenommen (* equally contributed).

13.2. Abstracts

Hofmann A, Ludwig H, Verma I, Pfeifer A. (2003) *Generation of Transgenic Animals by Use of Lentiviral Vectors*. 44. Frühjahrstagung der DGPT, März 2003, Mainz, Deutschland.

Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2003 Mar; 367(Suppl. 1): 13

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2004) *Highly efficient generation of transgenic pigs by lentiviral gene transfer*. 45. Frühjahrstagung der DGPT, März 2004, Mainz, Deutschland.

Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2004 Mar; 369(Suppl. 1): 12

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2004) *Efficient Production of Transgenic Pigs by Lentiviral Gene Transfer*. 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy (ASGT), Juni 2004, Minneapolis, USA
Mol Ther 2004 Jun; 9(Suppl. 1): 249

Hofmann A, Kress D, Kessler B, Wolf E, Pfeifer A (2004) *Specific Expression of Transgenes in Insulin-Secreting Islet Cells by Lentiviral Vectors*. 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy (ASGT), Juni 2004, Minneapolis, USA
Mol Ther 2004 Jun; 9(Suppl. 1): 382

Hofmann A, Pfeifer A (2004) *Lentiviral Transgenesis*. 2nd Annual International Conference on Transposition and Animal Biotechnology, Juli 2004, Minneapolis, USA

Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2005) *Efficient Generation of Transgenic Cattle by Use of Lentiviral Vectors*. 46. Frühjahrstagung der DGPT, März 2005, Mainz, Deutschland.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2005 Mar; 371(Suppl. 1): 16

Hofmann A, Kessler B, Zakhartchenko V, Everling S, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2005) *Lentiviral Transgenesis in Higher Mammals*. Biotechnology Havana 2005, November 2005, Havana, Cuba

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, Pfeifer A (2006) *Epigenetic Regulation of Lentiviral Transgene Vectors*. 47. Frühjahrstagung der DGPT, April 2006, Mainz, Deutschland.

13.3. Preise

Posterpreis des Vorstandes der DGPT für das Jahr 2003:

Hofmann A, Ludwig H, Verma I, Pfeifer A. (2003)
Generation of Transgenic Animals by Use of Lentiviral Vectors.
44. Frühjahrstagung der DGPT 2003, Mainz, Deutschland.

14. Lebenslauf

Name: Andreas Hofmann
Geburtsdatum: 14. Januar 1977
Geburtsort: Viernheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1983 - 1987 Grundschule (Schillerschule Viernheim)
1987 - 1996 Gymnasium (Albertus-Magnus-Schule Viernheim),
Abschluß: Abitur

Grundwehrdienst:

1996 - 1997 Kurpfalzkasernen Speyer, Ausbildung zum Kfz-/Panzerschlosser

Studium:

Oktober 1997 Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der Universität
Kaiserslautern
Oktober 1999 Abschluß der staatlichen Vorprüfung
Oktober 2001 Abschluß der Ersten Staatsprüfung
April 2002 Abschluß des Diploms

wissenschaftliche Tätigkeiten:

Februar - April 2001 Forschungspraktikum an der University of Queensland in
Brisbane (Qld, Australien), Thema: "*Analysis of flavonoids in
Australian honey using LC-ESI-MS and DAD*".
November 2001 - April 2002 Diplomarbeit der Lebensmittelchemie an der Universität
Kaiserslautern, Thema: "*Struktur-Wirkungs-Untersuchungen von
Lycobetain und davon abgeleiteten Phenanthridin-Derivaten*".
Juli 2002 - Mai 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Pharma-
forschung der Ludwig-Maximilian-Universität in München.